



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Mecanismes moleculars i cel·lulars de la neovascularització associada a la hipertensió portal i la cirrosi hepàtica

Ester García Pras



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



Tesi doctoral

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Medicina

Mecanismes moleculars i cel·lulars de la neovascularització associada a la hipertensió portal i la cirrosi hepàtica

Tesi presentada per

Ester García Pras

Per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Directora de tesi:

Dra. Mercedes Fernández Lobato

Tesi realitzada al grup d'Angiogènesi en Malalties Hepàtiques en el Laboratori
d'Hemodinàmica hepàtica i Hipertensió portal de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques
August Pi i Sunyer- Hospital Clínic de Barcelona-CEK

Programa de doctorat de Medicina i Recerca Translacional

Universitat de Barcelona 2018

“Si encontrara un lugar que me
hiciera sentir como Tiffany's
entonces compraría muebles y le
daría un nombre al gato”

Holly Golightly

Breakfast at Tiffany's

Truman Capote

Índex

	Pàg
Informe de la directora de tesi	3
Agraïments	5
1. Abreviacions	13
2. Introducció	19
2.1 Hipertensió portal i cirrosi hepàtica	21
2.2 Circulació intrahepàtica i cirrosi	23
2.2.1 Cèl·lula endotelial sinusoïdal	24
2.2.2 Cèl·lula hepàtica estrellada	28
2.2.3 Macròfags en el fetge: “not only Kupffer Cells”	31
2.3 Mecanismes extrahepàtics: circulació esplàncnica i sistèmica en HP	33
2.3.1 Vasodilatació arterial esplàncnica	35
2.3.1.1 Òxid nítric	35
2.3.1.2 Monòxid de Carboni (CO)	37
2.3.1.3 Prostaciclina	38
2.3.1.4 Glucagó	38
2.3.2 Hipocontractilitat de la cèl·lula muscular llisa	38
2.3.3 Neovascularització patològica a la hipertensió portal:	
tipus i regulació	39
2.3.3.1 Angiogènesi	43
2.3.3.2 Cèl·lules mare i vasculatura: Vasculogènesi post-natal	48
2.3.3.3 Mecanismes reguladors de l’angiogènesi patològica: VEGF	56
2.3.3.4 Mecanismes reguladors de l’angiogènesi patològica:	
regulació de VEGF per les proteïnes CPEB	62
3. Justificació i objectius	71

4. Còpies dels articles originals	77
4.1 Estudi 1: Role and therapeutic potential of vascular stem/progenitor cells in pathological neovascularisation during chronic portal hypertension	79
4.2 Estudi 2: Therapeutic siRNA targeting endothelial KDR decreases portosystemic collateralization in portal hypertension	99
5. Discussió	127
6. Conclusions	145
7. Bibliografia	151

Barcelona, 20 de setembre de 2018

La Dra. Mercedes Fernández Lobato, Cap del grup de recerca “Angiogènesi en Malalties Hepàtiques” de l’IDIBAPS, Barcelona,

CERTIFICA:

Que la tesi doctoral amb títol: *Mecanismes moleculars i cel·lulars de la neovascularització associada a la hipertensió portal i la cirròsi hepàtica*, presentada per Ester García Pras per a optar al títol de Doctora per la Universitat de Barcelona s’ha realitzat sota la meva direcció i compleix tots els requisits necessaris per a ser defensada davant el tribunal d’avaluació corresponent.

Dra. Mercedes Fernández Lobato

Agraïments

Agraïments

Quan una escriu i llegeix una tesi doctoral després de deu anys al grup, mescla de la casualitat, l'oportunisme i un punt d'orgull, es fa evident que ha d'agrair molt a molts.

Una tesi és una oportunitat, un treball, un esforç i al final una etapa de la vida, i sovint no solem donar-li la importància que realment té. Un recorda els anys d'infantesa amb nostàlgia, l'etapa universitària com un regal de llibertat extrema i els anys de tesi com una llosa feixuga de la que costa molt lliurar-se'n. Jo no puc dir que hagi estat així, perquè sense voler he estat doctoranda un any i mig. Vaig començar a treballar al laboratori d'Hemodinàmica Hepàtica com a tècnic, perquè a mi el que més m'ha agradat i m'agrada és fer poiata. Al final per creure't la ciència, l'has de fer, l'has de tocar, l'has de viure per poder caure, frustrar-te i algun dia il·lusionar-te.

Per això agraeixo a la **Mercedes** que m'hagi deixat acabar una cosa que en realitat no vaig començar, que ha vingut una mica sola. Crec sincerament que sense ser una cosa premeditada a la Mercedes li ha fet il·lusió que haguem empaquetat aquests anys, aquesta feina i n'haguem fet una tesi doctoral; perquè sempre ha confiat en la nostra feina i en el nostre criteri. Tampoc puc deixar de mencionar al **Jaume**, perquè ell em va donar la oportunitat d'establir-me en aquest laboratori i sé que sempre ha confiat en mi i m'ha apreciat de manera personal. Tot i no ser director d'aquesta tesi, ho podria ser perfectament.

Montserrat, espero que sàpigues que també ets directora d'aquesta tesi. I si no tranquil·la que t'ho dic ara. Ets la persona que m'ha encoratjat a fer això; et considero tan valenta i persistent... Si algú pot doblegar el sistema ets tú. I de retruc no puc deixar de mencionar a la **Loreto**, una altra dona forta i valenta que m'ha inspirat molt al llarg d'aquests anys. Espero que t'ho creguis, perquè és així. I tot i que no em puc permetre afirmar-ho categòricament, diria que ha de ser un plaer treballar amb tu.

De totes maneres la persona que m'ha dut fins aquí ha estat el **Javi**, tot i que ell dirà que no... que la culpa és meva, i que no em perdonarà mai el que li he fet. Però la veritat és que ell em va fer anar a buscar el títol de màster i allà li vaig dir: “si recollim aquest títol ens matriculem al doctorat”. I com que es veu que mano tant, doncs ja no em va dir que no... i aquí estem.

Ara seriosament; **Javi**, Gallego, monín, tú tienes la “culpa” que haya escrito esta tesis y no te lo perdonaré jamás. Me ha encantado hacer ciencia contigo, día a día, mica en mica, con subidas y bajonas, momentos buenos y otros mejores, con sabor del sur y un humor inigualable. Así que gracias por todo, por estar.

Marc, quan vaig veure per primera vegada com feies un estudi hemodinàmic en rata i només pensar que ho havia de fer jo, vaig pensar que duraria dos dies en aquesta feina. Però em vas ensenyar bé i la veritat que he après molt de tú, sobretot a relativitzar els fracassos, que en són molts en la nostra feina. Sempre m'has animat en tot, també en això i t'ho agraeixo de cor.

Laura, ja fa temps que no ets al lab i et trobo tant a faltar.... sí, no, bé potser sí, o ben pensat no.... i també a la teva cabellera tant salvatge com autèntica. Sempre t'he sentit molt a prop i m'ha agradat molt compartir els teus anys de tesi, dins i fora del lab. Ara no tinc tant temps, i ens veiem poquet, però reconec que no em faria res tornar a treballar amb tú, de fet m'encantaria tornar a treballar amb tú; crec que vam fer un bon equip.

La **Montse** i la **Marta**, són dues bones amigues que han hagut d'aguantar-me en tots els moments, i encara m'aguanten, no sé com. Els agraeixo els moments al lab, la generositat dins i fora, els viatges a Bologna i la complicitat. La Montse fa un gran bé en aquest laboratori, no ho saben prou, i et vull agrair, en nom de tots la gran feina que fas. Espero que algun dia algú de dalt i de baix et digui que vals molt, científicament i no, perquè un laboratori que funcioni és més que una tècnica, una compra o un paquet.... Sincerament la hemodinàmica no sap el que té. Marta, en part m'has inspirat a escriure la tesi, tan tard, tan liada, tan mare! Tú no et rendeixes mai o què? Si hi ha dones empoderades aquestes

sou vosaltres dues. No voldria deixar-me el **Marcos Pasarín**, que tot i no ser una dona empoderada va compartir amb nosaltres tres moments tan bons! Amb un humor inclassificable, sempre vas tenir un moment per ajudar-me i ho recordo molt. Gràcies!

Carolina, que bueno fue compartir laboratorio contigo. Pocas personas he conocido, sobre todo clínicas, con tantas ganas de aprender y con tanto respeto por los que hacemos lo que podemos en ciencia básica. Nos ha quedado una bonita amistad que seguimos conservando en la (poca) distancia que separa Barcelona de Cesenatico. Grazie mille!

Igualmente **Annalisa**, muchas gracias por confiar siempre en mi, tú siempre me animaste a hacer esto. Creo que estarás contenta por mi, de manera sincera. Te echamos de menos, a ti y a tu refranero italiano!

Y no puedo dejar Italia sin dar las gracias a **Vincenzo**, aunque a la vez no tengo palabras. Qué alegría cada vez que venías! Dejaste un gran vacío cuando te marchaste. Ci vediamo!

A l'**Héctor** ja el coneixia abans d'arribar, però no havíem coincidit fins que vaig arribar al laboratori. Tot i el teu posat seriós, ets un tros de pa! Sempre disposat a donar un cop de mà, accessible en tot moment, company de confidències i un crack amb els animals. Tampoc saben el que tenen al laboratori. Espero que sí que et serveixi que jo et valori molt!

Eugenio, Diana.... moltes gràcies pels bons moments, per mirar-vos la vida sempre amb tant optimisme i contagiar-nos-ho sempre. Us va bé en la vostra nova etapa perquè us ho mereixeu.

Núria! Cavall indomable, Rubia, puc afirmar que no he conegut becària com tú! Sento moltíssim haver-me portat a vegades més com una mare que no pas com una companya d'aventures. Però m'has fet riure molt, i crec que m'has rejuenit uns anys, que ja em feia falta! Gràcies per traspasar-me una mica de la teva energia vital cada dia i tot i que et diria que no canviïs mai, fés cas a algú alguna vegada!!!

Marta, gràcies per les vivències i riures al lab. Crec que ets una persona que no defalleixes mai i això és important en aquesta feina. Et desitjo un bon final de tesi, que estic segura que tindràs. **Salva**, un plaer compartir lab contigo, aunque nos hagas pasar esos calores en el estabulario limpio y me creas tacetera cuando en realidad no lo soy tanto.

I gràcies al laboratori al complert: **Marina, Sergi Vila, Sergi Guixé, Anabel, Peyo, Zoe, Genís, María, Erica, Raquel, Martí, Nico, Giusi i Francesco....** sempre tothom disposat a donar un cop de mà!

També gràcies als caps de grup: **Jordi, Joan Carles, Virgínia** i al **Juan G.Abraldes** pel vostre suport i confiança en tot moment.

També vull agrair moltíssim el temps compartit amb el laboratori veí, “els **Forns**” com solem dir. Gràcies a la Sofía, que sempre ens dóna bons consells, a la Patri tan genuïna i autèntica, al Martín, un ciutadà del món amb tant per oferir...; Gràcies al Carlos, aquest manxec amb tanta saviesa amb el que vam compartir la seva tesi, la nostra tesi i les seves guàrdies.... gràcies a la Laura pel seu optimisme extrem i a la Mairene, a la Mireia, a l'Elena, a la Zoe, a la Thais.

Elisabet, fa temps que no compartim ni dinars ni coverses, però t'agraeixo sempre la teva fe cega i la teva empatia sincera. La vida t'ha recompensat bé perquè t'ho has guanyat.

Als “**Checa**”, merci a la Susana, a la Fucho, a l'Anna Moles, la Sandra, la Gemma, al David, al Fabián, a la Naroa, a l'Estel... sou uns molt bons companys de planta.

Moltes gràcies a la família, no seria aquí sense els meus pares, **Tomàs i Maribel**, que sempre m'han donat suport en tot absolutament, sense preguntar ni jutjar i sempre disposats a ajudar incondicionalment. El que tinc més clar és que segur que sense vosaltres no ho hauria pogut fer. **Núria**, gràcies per ser-hi sense ser-hi i per l'ajuda prestada durant la vida, que tants anys hem compartit. No tinc una família llarga, uns tiets i un cosí, però hem fet pinya els darrers anys i seguirem fent-ho. Gràcies. També gràcies als meus sogres, cunyats i cosins postissos, que sempre han vist en mi el que a vegades jo no veia.

Gràcies **Xavi** per estimar-me (i aguantar-me) en el transcurs de tants anys. No sempre sóc fàcil i es requereixen grans dosis de paciència, sobretot en moments d'estrès i atabalament, com pot ser una tesi doctoral. Espero que aquesta tesi ens compensi i ens recompensi, ja sigui ara o en un futur. Als meus fills, **Valentina** i **Lluc**, moltes gràcies per haver-me allunyat del laboratori tantes vegades.

I sobretot gràcies als meus avis, **José** i **Felisa**, que n'estarien molt orgullosos. Perquè ells m'han fet com sóc i perquè em van ensenyar que si hi ha terra és aquella on són els teus. Ni del nord ni del sud, sempre agraïts a la vida, SIEMPRE ADELANTE! Si esta tesis es de alguien es vuestra, sin ninguna duda. Es una suerte que no veais en que se está convirtiendo el mundo que vosotros hicisteis mejor. Qui sap, potser encara hi som a temps...

Abreviaciones

1. Abreviacions

4E-BP	Proteïnes d'unió a 4E
Ace	Enzim convertidor d'angiotensina
AMPc	Adenosina monofosfat cíclica
Ang (1-7)	Angiotensina (1-7)
ANG-1/2	Angiopoietina 1/2
ARN	Àcid ribonucleic
ATP	Trifosfat d'adenosina
Bcl-2	Linfoma de cèl·lula B 2
BH4	Tetrahidrobiopterina
BMP	Proteïnes morfogenètiques de l'os
BrdU	Bromodesoxiuridina
CCL2/3/4/5	Quimocina motiu (C-C) lligand 2/3/4/5
CCR2	Receptor de la quimocina motiu (C-C) lligand 2
CD105	Clúster de diferenciació 105
CD133	Clúster de diferenciació 133
CD141	Clúster de diferenciació 141
CD144	Clúster de diferenciació 144
CD146	Clúster de diferenciació 146
CD-31	Molècula d'adhesió endotelial plaquetària-1
CD34	Clúster de diferenciació 34
CD45	Clúster de diferenciació 45
CD73	Clúster de diferenciació 73
cGMP	Guanosín monofosfat cíclic

cKit	Proteïna cinasa de tirosines kit
COX-1/2	Ciclooxygenasa 1/2
CPE	Elements de poliadenilació citoplasmàtica
CPEBs	Proteïnes d'unió als elements de poliadenilació citoplasmàtica
CTGF	Factor de creixement de teixit connectiu
Cy3	Cianina 3
DLL4	Proteïna tipus delta 4
EC	Cèl·lula endotelial
endMT	Transició endotelial a mesènquima
eNOS	Sintasa d'òxid nítric endotelial
EPC	Cèl·lula progenitora endotelial
ERK	Cinases regulades per senyal extracelular
ET-1	Endotelina 1
FGF	Factor de creixement de fibroblasts
GFAP	Proteïna àcida fibrilar glial
GLD-2	Polimerasa de línia germinal i desenvolupament 2
GREM1	Gremlina 1
GTP	Trifosfat de guanosina
HDAC3	Desacetilasa d'histones 3
HO-1	Hemoxygenasa 1
HSC	Cèl·lula hepàtica estrellada
HSPGs	Proteoglicans heparan sulfat
HUVEC	Cèl·lules endotelials humanes de cordó umbilical
IL-13	Interleucina 13
IL-1 β	Interleucina 1 beta

IL-6	Interleucina 6
JAG1	Proteïna Jagged 1
KC	Cèl·lula Kupffer
KDR	Receptor amb domini insert-cinasa
KO	Noquejar
LPS	Lipopolisacàrid
LSEC	Cèl·lula endotelial sinusoidal hepàtica
LTC4	Leucotriè C4
LTD4	Leucotriè D4
LTE4	Leucotriè E4
MAPK	Proteïna cinasa activada per mitògens
MasR	Receptor Mas
MMPs	Metal·loproteïnases
MSC	Cèl·lula mare mesenquimal
mTOR	Diana de la Rapamicina en mamífers
NAFLD	Fetge gras no alcohòlic
NFAT	Factor nuclear de cèl·lules T activades
NF-kB	Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèls B
NO	Òxid nítric
NRP1/2	Neuropilines 1/2
Oct-4	Factor de transcripció d'unió a octàmer 4
PABP	Proteïna d'unió a la cua de poliadenines
PDGF	Factor de creixement derivat de plaquetes
PDGFR-β	Receptor beta de PDGF
PEDF	Factor derivat de l'epiteli pigmentari

PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfat
PLC- γ	Fosfolipasa C gamma
Poly(A)	Cua de poliadenines
PPVL	Lligadura parcial de la vena porta
ROS	Espècies reactives d'oxigen
RTK	Receptor tirosina cinasa
Sca-1	Antígen de cèl·lula mare 1
siRNA	ARN interferents petits
SMA- α	Actina de múscul llis alfa
SOD	Superòxid dismutasa
SRC	Cinases de tirosines citoplasmàtiques
TGF- β	Factor de Creixement transformant β
TLR4	Receptor tipus Toll 4
TNF- α	Factor de necrosi tumoral alfa
UEA-1	Aglutinina Ulex Europaeus I
UTR	Regió no traduïda
VCAM-1	Molècula 1 d'adhesió de cèl·lules vasculars
VE-cadherina	Cadherina d'endoteli vascular
VEGF	Factor de creixement de l'endoteli vascular
VEGFR-1/2	Receptor 1/2 de VEGF
WT	Fenotip salvatge

Introducció

2. Introducció

2.1 Hipertensió portal i cirrosi hepàtica

La hipertensió portal és una síndrome clínica caracteritzada per un augment de la pressió en el sistema venós portal hepàtic, configurat per la vena porta i les seves branques i que drena al fetge la circulació sanguínia procedent de l'intestí, la vesícula biliar, la melsa i el pàncrees.

La hipertensió portal es defineix com un increment patològic del gradient de pressions entre la vena porta i la vena cava inferior, essent els valors normals entre 1 i 5 mmHg. És ben sabut que les malalties cròniques del fetge, i més concretament la cirrosi hepàtica, són la principal causa d'hipertensió portal i alhora aquesta hipertensió és la principal complicació d'aquestes malalties i responsable de la major causa de mort i de transplantament hepàtic al món. Només a Europa s'estima que 29 milions de persones pateixen malalties hepàtiques cròniques i que cada any en moren 170.000 per aquesta causa, excedint la mortalitat associada al càncer de pit, per exemple¹.

La hipertensió portal juga un paper crucial en la transició d'una fase preclínica de la cirrosi hepàtica a una fase clínica, amb conseqüències greus pel pacient. Es parla d'una hipertensió clínicament significativa quan el valor del gradient de pressions excedeix el llindar de 10mmHg, ja que és llavors quan apareixen les complicacions més greus per al pacient². El sagnat de varius i l'ascites rarament apareixen fins que el gradient de pressió portal no supera els 10-12 mmHg. L'increment de la pressió portal afavoreix el desenvolupament de la circulació col·lateral, concretament per les varius gastroesofàgiques. Aquestes varius tendeixen a augmentar de mida en paral·lel amb l'increment de pressió portal, i poden trencar-se quan la tensió de la paret excedeix uns nivells crítics. El sagnat de varius és la complicació més important de la cirrosi hepàtica ja que marca la progressió de la descompensació de la malaltia cap a un estadi amb un risc elevat de mort. S'ha de remarcar, que tot i els avenços aconseguits en les últimes dècades

pel que fa al tractament, el sagnat de varius continua arrossegant una mortalitat al voltant d'un 20% després d'un episodi d'hemorràgia.

L'aparició d'ascites, la sèpsia i l'encefalopatia portosistèmica són altres greus complicacions derivades d'aquesta hipertensió portal.

L'evolució en el coneixement de la fisiopatologia de la hipertensió portal ha canviat el paradigma de la malaltia; la recerca clínica i bàsica de les últimes 3 dècades han aportat molta llum en aquest camp, a causa bàsicament de l'aparició de nous mètodes d'avaluació clínica i també de l'avenç en tècniques cel·lulars, moleculars i l'ús de models animals ben caracteritzats. L'objectiu primordial és mantenir la pressió portal en nivells que no excedeixin els 10mmHg; així es podrien prevenir gran part de les complicacions de la hipertensió portal i la cirrosi descompensada, i es mantindria al pacient en aquest estadi preclínic o compensat de la malaltia, reduint considerablement el risc de mortalitat i/o de transplantament hepàtic.

Igual que en qualsevol altre sistema dinàmic, i segons la llei d'Ohm, el gradient de pressió portal és directament proporcional al flux de sang circulant pel sistema venós portal (Q) i a la resistència que s'oposa a aquest flux (R):

$$\Delta P \text{ (gradient de pressió)} = Q \text{ (flux sanguini)} \times R \text{ (resistència)}$$

Per tant, desde un punt de vista teòric un increment en la pressió portal seria secundari a un increment de la resistència o del flux sanguini, o a una combinació de tots dos ¹.

La hipertensió portal s'inicia en primer terme per un increment de la resistència vascular al flux sanguini portal. Aquesta resistència es pot produir a nivell presinusoidal (trombosi portal venosa), a nivell sinusoidal (cirrosi hepàtica, hepatitis crònica, malaltia per alcohol o esquistosomiasi) i inclús a nivell postsinusoidal (síndrome de Budd-Chiari). Però el cert, és que la principal causa d'aquest increment de la resistència vascular és deguda a alteracions estructurals del fetge cirròtic, com ara una distorsió de l'arquitectura vascular

hepàtica causada per la fibrosi, l'aparició de cicatrius i per la formació dels nòduls de regeneració. Però la recerca en aquest camp les últimes dècades ha posat de manifest que aquesta resistència no és només una conseqüència mecànica del canvis arquitecturals del fetge, sinó que existeix un component dinàmic que hi col·labora de manera remarcable. Bathhal i Grossmann van ser els primers en descriure que el dèficit de substàncies vasodilatadores i l'excés de vasoconstrictores representaria fins a un 30-40% de l'increment total de la resistència vascular intrahepàtica ³, i que actuar farmacològicament contra aquest component dinàmic podria reduir fins a un 30% la pressió portal en cirrosi ⁴.

2.2 Circulació intrahepàtica i cirrosi

Durant el desenvolupament de dany hepàtic i cirrosi, el teixit hepàtic sofreix una sèrie de canvis importants; els hepatòcits veuen com la seva membrana plasmàtica perd els villi però el sinusoides hepàtic és el que patiria els canvis més prominents; de fet tots els components cel·lulars del sinusoides participen en la resposta patològica vasoactiva del fetge cirròtic. Les cèl·lules endotelials sinusoidals (LSEC) i les cèl·lules Kupffer (KC) adquireixen un fenotip predominantment vasoconstrictor que a més s'agreuja en resposta a estímuls biomecànics i inflamatoris (Figura 1). A més els elements contràctils, les cèl·lules hepàtiques estrellades (HSC), també reaccionen de manera exagerada a les molècules vasoconstrictores i això acaba incrementant el to vascular ^{5,6}.

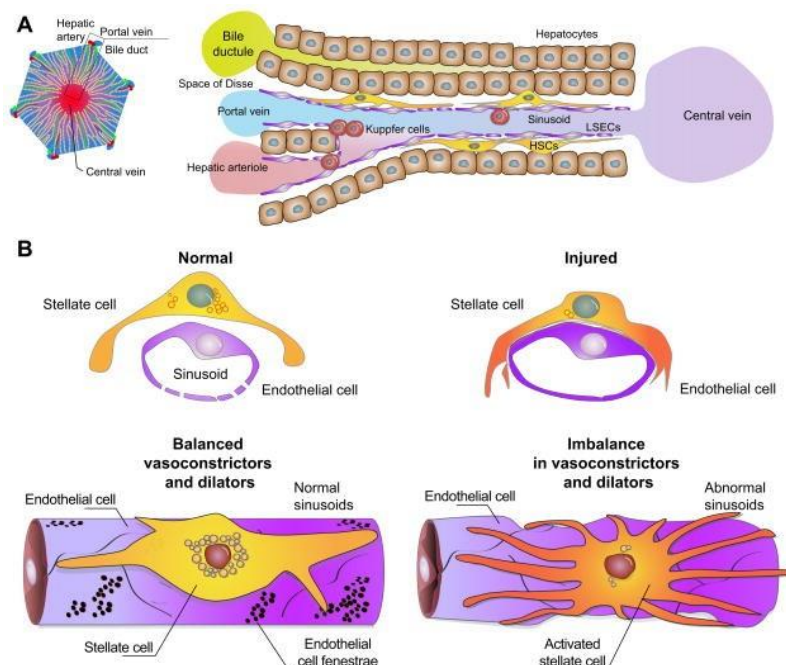


Figura 1: Canvis en el sinusoide hepàtic en resposta a dany al fetge. Adaptada de Iwakiri Y, *Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis*, J. Hepatology (2014)

2.2.1 Cèl.lula endotelial sinusoidal

Un sinusoide és un tipus de vas sanguini terminal amb una capa endotelial completa i sense túnica adventícia, que apareix en certs òrgans com ara el fetge, el pàncrees o les glàndules suprarenals. Les LSEC formen la paret dels sinusoides i representen aproximadament el 15% de les cèl·lules del fetge. Aquest tipus cel·lular presenta un fenotip singular ja que la seva membrana basal està fenestrada, donant un caràcter discontinu a l'endoteli i afavorint així una major difusió de nutrients i oxigen i modulant el to vascular⁵. El seu rol en el desenvolupament de la hipertensió portal és cada vegada més reconegut, i els estudis de les passades dues dècades demostren clarament la seva contribució a l'increment de la resistència vascular intrahepàtica. Aquest és un fet

important ja que tradicionalment s'havien vist aquestes cèl·lules com a meres transportadores de macromolècules i per tant amb un rol ben passiu.

Davant d'un dany elles són les que canvien primer, inclús abans que els propis hepatòcits. Pateixen el que s'anomena pseudocapillarització: la seva membrana basal perd les fenestres, i comença a expressar molècules com CD31, VCAM-1, COX-1 i ET-1 alhora que adquireix un fenotip vasoconstrictor, protrombòtic, proinflamatori, i inclús profibròtic. En condicions normals i fisiològiques l'endoteli és capaç de generar estímuls vasodilatadors en resposta a increments de volum sanguini, pressió sanguínia o agents vasoconstrictors per tal de pal·liar aquests fenòmens. S'ha observat recentment que en determinades condicions patològiques, com ara la hipertensió arterial, la diabetis o la hipercolesterolèmia, aquesta vasodilatació depenent d'endoteli es troba disminuïda. És el que es coneix com a disfunció endotelial, essent un dels mecanismes principals implicats en l'augment del to vascular.

Durant la progressió de dany hepàtic l'endoteli sinusoidal produeix i allibera una menor quantitat de molècules vasoactives. Concretament la disminució de la biodisponibilitat d'òxid nítric ha estat objecte de molts i profunds estudis en la última etapa de la recerca en hemodinàmica hepàtica. L'òxid nítric (NO) és el lligand natural de la guanilat ciclasa soluble, enzim que finalment produeix la molècula cGMP (cyclic guanosine monophosphate) a partir de GTP (guanosine triphosphate). El cGMP és el responsable final de la relaxació de la paret vascular (per extrusió del calci citosòlic). L'enzim sintasa endotelial d'òxid nítric (eNOS) és la productora principal d'aquesta molècula vasoactiva, i actua oxidant la L-arginina i convertint-la en L-citrullina + NO (Figura 2). La seva activitat depèn del seu estat de fosforilació, i aquest alhora depèn de l'activitat de Akt. En cirrosi, els baixos nivells d'òxid nítric són deguts a una disminució de l'activitat de l'enzim eNOS atribuïda a una menor fosforilació en els seus llocs actius, a una major unió a la proteïna inhibidora caveolin-1 o a una regulació negativa de la seva activitat per la via de RhoA/Rho-kinase pathway, que se sap està activada en el fetge cirròtic⁶.

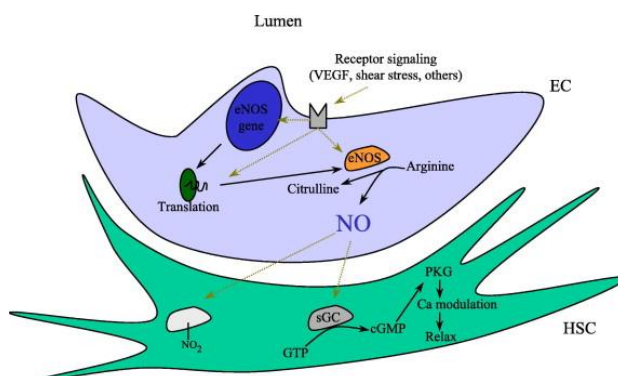


Figura 2: Regulació de l'òxid nítric en la cèl·lula endotelial sinusoidal hepàtica. Extreta de Langer, D.A. *Nitric oxide and portal hypertension: Interface of vasoreactivity and angiogenesis* J. Hepatology (2006)

A banda de la disminució de NO en LSEC, també es coneix que l'estrès oxidatiu està implicat activament en l'augment de to vascular en el fetge cirròtic. Les espècies reactives d'oxigen (ROS), com per exemple l'ió superòxid (O_2^-) es troben elevats en el fetge cirròtic, en part degut a la disminució de l'expressió i activitat d'un enzim que les elimina, la superòxid dismutasa (SOD). Aquests radicals segresten l'òxid nítric formant peroxinitrits i en conseqüència disminuint-ne la seva biodisponibilitat⁷ i també oxidant i inactivant el principal cofactor de la eNOS, la tetraidriobioterina (BH4), fenomen que es coneix com a eNOS uncoupling⁸. En cirrosi, a més, els nivells de BH4 també es troben disminuïts a causa de la menor expressió i activitat de l'enzim que els produeix: la GTP cilo-hidrolasa.

Per altra banda ja havíem mencionat que l'increment de la resistència vascular intrahepàtica és també degut a una producció exagerada de molècules vasoconstrictores, com per exemple l'endotelina, els eicosanoids i els leucotriens, l'angiotensina II o els agonistes adrenèrgics entre d'altres.

L'**endotelina**, per exemple, en condicions normals l'expressen les LSEC per mantenir una correcta homeòstasi en la circulació intrahepàtica. Però durant el dany hepàtic passa a ser produïda principalment per les cèl·lules hepàtiques estrellades i on actua de manera autocrina promovent la seva proliferació, contracció i inclús la producció de matriu extracel·lular⁹. De totes maneres, tot i estar demostrat que els pacients cirròtics tenen nivells elevats d'endotelina circulants, no hi ha consens sobre l'efecte de l'ús d'antagonistes de l'endotelina per disminuir la pressió portal.

L'**angiotensina II** també és un potent vasoconstrictor que es troba elevat en pacients amb cirrosi hepàtica a resultes de l'activació del sistema renina-angiotensina¹⁰. Semblaria que prevenir l'activació del sistema renina-angiotensina podria tenir efectes beneficiosos disminuint pressió portal en cirrosi, però bloquejar angiotensina II causa hipotensió sistèmica i té conseqüències adverses per a la funció renal, així que redueix el seu potencial terapèutic significativament.

Els **eicosanoids** són uns altres factors que contribueixen addicionalment a la vasoconstricció intrahepàtica; s'hi inclouen les prostaglandines derivades de la ciclooxigenasa (COX) com són la prostaglandina H2 i el tromboxà A2. En el fetge cirròtic COX-1 i COX-2 estan sobreexpressades i contribueixen per tant a un augment del to vascular. El mateix ocorre amb els leucotriens, LTC4, LTD4 i LTE4, amb potent efecte vasoconstrictor i capacitat proliferativa i profibrogènica¹¹. Aquests leucotriens també es troben elevats en fetges cirròtics i el bloqueig del seu receptor redueix la pressió de perfusió portal, suggerint el seu rol en la resistència vascular intrahepàtica.

La comunicació paracrina i les interaccions cèl·lula-matriu dins el nínxol sinusoidal són reguladors claus del fenotip i funció de les cèl·lules que l'integren. La producció local d'òxid nítric per part de les LSEC diferenciades promou la quiescència de les HSC i l'activació de la via de VEGF-NO en hepatòcits i estrellades mantindria les LSEC en un estat quiescent i diferenciat. La disrupció d'aquesta comunicació o "cross-talk" paracrí en aquest nínxol sinusoidal promou la fibrosi i la disfunció endotelial en la cirrosi (Figura 3).

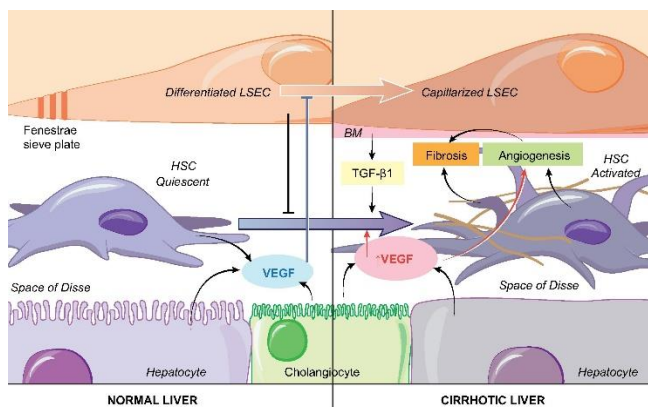


Figura 3: Rol de les cèl·lules endotelials sinusoidals de fetge (LSECs) en malalties cròniques hepàtiques. Extreta de Poisson, J. *Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases*, J. Hepatology (2017)

2.2.2 Cèl·lula hepàtica estrellada

Les cèl·lules estrellades hepàtiques també pateixen canvis durant la progressió del dany hepàtic. En condicions basals aquest tipus cel·lular, abans conegut com a “fat-storing cells”, acumula greix i vitamina A. Es localitza a l’espai de Disse, entre la cèl·lula endotelial sinuoidal i l’hepatòcit, i representa entre el 5-8% del total de cèl·lules del fetge. La seva particular distribució intrahepàtica, envoltant les LSEC les fa responsables del control del to vascular tot i que no està clar si en condicions fisiològiques tenen propietats contràctils. Però en resposta a dany hepàtic, es produeix el que s’anomena activació de la cèl·lula estrellada; canvia el seu fenotip, comencen a proliferar i a produir grans quantitats de proteïnes de matriu com els col·lagen I i III i els proteoglicans. La morfologia de la cèl·lula també canvia, passant a un fenotip miofibroblàstic i perdent les acumulacions de greix (retinoid droplets)¹².

El coneixement de la patogènesi de la fibrosi hepàtica ha anat millorant a resultes de l’aparició de nous i millors models animals i l’anàlisi dels teixits humans. En gairebé tots

els processos fibròtics de l'organisme la fibrosi es troba precedida per la inflamació, i tant elements de la immunitat innata com de la adaptativa juguen papers importants en el procés fibròtic. En un context de dany hepàtic, l'insult (tòxic, víric....) fa que les cèl·lules epitelials (hepatòcits o colangiòcits) que alliberin mediadors inflamatoris i engeguin una cascada antifibrinolítica. Es recluten leucòcits als llocs de dany per tal de fagocitar cèl·lules mortes o en apoptosi i alhora amplifiquen la resposta inflamatòria generant citocines proinflamatòries tipus TNFalfa, IL-6, IL-1B i reclutant limfòcits T¹³.

Però a part d'aquestes molècules tan conegudes i estudiades, s'alliberen factors de creixement com el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), el factor de creixement transformant (TGF- β), el factor de creixement de teixit connectiu (CTGF) o IL-13 que activen la diferenciació dels precursors mesenquimals a miofibroblasts (Figura 4). A més, la fagocitosi d'hepatòcits apoptòtics per part de les cèl·lules hepàtiques estrellades també és una senyal d'activació per elles. TGF β és la citocina profibrogènica més important i responsable de la regulació a l'alça de l'alfa-SMA i de la producció de col·lagen tipus I per part de les HSC activades¹⁴. El PDGF en canvi actua com a inductor de la proliferació d'aquestes cèl·lules o miofibroblasts, per vies dependents o no de cinases com ERK. No cal oblidar que l'augment de permeabilitat intestinal que es troba en algunes situacions de dany hepàtic (alcoholic liver disease o NAFLD) permet una translocació bacteriana que eleva els nivells del lipopolysaccharide (LPS) en sang i que de retruc acaba activant les HSC i KC a través de les vies de senyalització de TLR4¹⁵.

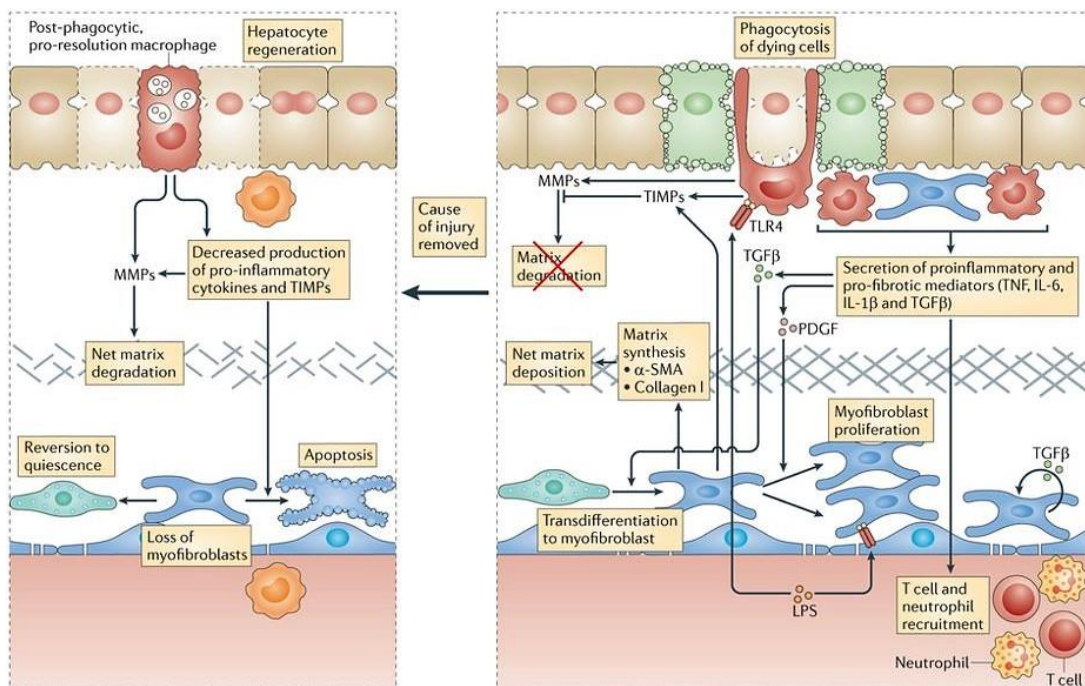


Figura 4 : Cascada de senyals produïdes després d'un dany hepàtic. Adaptada de Pellicoro, A. *Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ*, Nature Reviews (2014)

No és nou el concepte que els responsables de la fibrosi hepàtica són en últim terme els miofibroblasts; els últims temps han abastat molta recerca en aquest camp i el que se'n pot concloure finalment és que en la gran majoria de les etiologies de dany hepàtic, els miofibroblasts hepàtics productors de fibra són derivats exclusivament de l'activació de cèl·lules mesenquimals residents, és a dir les HSC quiescents (i els fibroblasts portals en malalties biliars). Expressen marcadors com la desmina o la GFAP a part d'acumular lípids i vitamina A ¹⁶. S'activen en resposta a molècules proinflamatories i profibrogèniques, però és cert que fenòmens epigenètics com la metilació de la CpG-binding protein2 promouen la seva diferenciació a miofibroblast.

El que és més desconegut, però no menys rellevant és el paper de les HSC com a cèl·lules de la immunitat innata. Elles mateixes són productores de citocines proinflamatòries i quimiocines com la CCL2 (liligand de CCR2 (CC-chemokine receptor 2)), i les CCL5, CCL3 i CCL4. També expressen receptors de quimiocines i responen a components bacterians a través de TLR4, funcionant com a cèl·lules presentadores d'antigen en un fetge danyat¹⁷. I com ja s'havia mencionat abans, igual que en altres tipus de processos fibròtics a l'organisme, tenen alta capacitat fagocítica.

2.2.3 Macròfags en el fetge: “not only Kupffer Cells”

Els macròfags del fetge, són sense cap dubte, la població immune hepàtica més estudiada en fibrosi hepàtica; de fet es localitzen molt properes a la cèl·lula estrellada o miofibroblast, en les àrees de teixit cicatritzant. Estudis on aquesta població hepàtica es troba deplecionada, els fetges mostren un número menor de fibroblasts derivats d'HSC i una atenuada fibrosi, cosa que fa indicar que els macròfags tenen una clara propietat profibròtica¹⁸. Dins l'heterogeneïtat dels macròfags tissulars, la recerca s'ha focalitzat en descriure la població de macròfags profibrogènics i de fet se'n descriuen dues poblacions: els macròfags residents o KC i els macròfags derivats de monòcits reclutats de circulació. Les KC són la població predominant en el fetge sa, i hi resideixen des de l'etapa prenatal. S'hi mantenen en etapa adulta per autoregeneració o self-renewal, sense cap contribució d'altres poblacions monocítiques. Es localitzen en el sinusoides hepàtic, cosa que els permet estar a primera línia i en contacte directe amb els antígens transportats per via portal. En resum les KC tenen un paper crucial homeostàtic protegint l'hoste ja que són capaces d'induir respostes immunogèniques i de tolerància ¹⁷.

En situacions de dany hepàtic, la població de macròfags al fetge canvia: les KC responen ràpidament i en primer terme, secretant citocines proinflamatòries com CCL2 i CCL5. Però llavors, durant la inflamació hepàtica i la fibrogènesi disminueixen molt en nombre, i només quan es resol la fibrosi tornen a “reomplir” el fetge. En situació de dany el

número de monòcits reclutats al fetge augmenta molt, suggerint que tenen propietats profibrogèniques¹⁹. I de fet és així, perquè quan s'inhibeix el principal quimioattractant dels monòcits CCL2 o queda deplecionat genèticament el seu receptor, CCR2, cau la infiltració de macròfags en resposta a dany i de resultes disminueix marcadament la fibrosi en fetge²⁰.

Quins són els mecanismes pels quals els macròfags promouen la fibrogènesi? Doncs produeixen un ampli rang de citocines, quimiocines i factors que estimulen les HSC i els fibroblasts; Concretament expressen TGF β , que promou directament l'activació de les HSC, però també trombospodina 1 o PDGF, potent mitògen d'aquests miofibroblasts. També galectin3, una lectina que promou l'activació dels miofibroblasts, i citocines proinflamàtòries com TNF α i IL-1 β que via NF- κ B promouen l'activació i supervivència de les HSC activades, contribuint a la fibrogènesi²¹.

Comprendre els mecanismes que duen a la fibrosi i com aquesta pot arribar a ser modulada per les pròpies cèl·lules del fetge és crucial per dissenyar les estratègies terapèutiques que fomentin la regressió en pacients ja cirròtics i amb gran quantitat de fibra. La resolució de la fibrosi, facilitada pels macròfags i pels seus efectors (metal·loproteïnases), però també per altres tipus cel·lulars com els neutròfils i les cèl·lules dendrítiques, és el camp de batalla en la recerca actual. Però també està clar que hi ha factors que limiten la reversibilitat de la fibrosi hepàtica; per bé que el dipòsit de fibra a causa d'un dany hepàtic es considera una resposta homeostàtica de cicatrització, un insult persistent i crònic porta a una sèrie d'alteracions tant en la quantitat com en la composició de la fibra, així com modificacions bioquímiques en el col·lagen (crosslinking) que fan que les matrius madures siguin més resistents a les proteases. Els canvis angioarquitecturals, com els septes vascularitzats que solen acompanyar la cirrosi, són probablement irreversibles i per tant porten a un punt de no retorn¹⁶.

2.3. Mecanismes extrahepàtics: circulació esplàncnica i sistèmica en la hipertensió portal

Les malalties cròniques del fetge, entre les que s'hi inclou la cirrosi hepàtica, s'acompanyen de profunds canvis i distorsions que no queden limitats només al fetge. Està ben descrit actualment que la cirrosi hepàtica s'associa a un síndrome circulatori hiperdinàmic caracteritzat per un augment del cabal cardíac i una disminució de la resistència vascular perifèrica. Aquesta síndrome hiperdinàmica, típica complicació de la cirrosi, és en realitat una complicació de la hipertensió portal, ja que de fet es troba en qualsevol forma i etiologia de la hipertensió portal, hi hagi o no cirrosi¹.

Per fer una mica d'història, abans dels anys setanta, la teoria que dominava no era pas aquesta; es pensava que la hipertensió portal era fruit exclusivament de l'increment de la resistència vascular intrahepàtica i s'assumia una circulació esplàncnica hipodinàmica amb una resistència vascular mesentèrica augmentada...i això estava basat en un flux portal disminuït just a l'entrada del fetge. Però aquesta dada no era ben acurada, perquè no tenia en compte tot el flux col·lateral que s'escapava de la circulació hepàtica. A la dècada dels setanta apareixen els primers estudis que suggereixen que en realitat la circulació esplàncnica en hipertensió portal és hiperdinàmica²² i els treballs amb models animals acaben d'aprofundir en la caracterització dels canvis hemodinàmics que ocorren durant la inducció de la hipertensió portal. Aquests estudis demostren inequívocament que hi ha un primer i curt moment de circulació hipodinàmica, atribuïble principalment a l'increment de la resistència intrahepàtica i quan encara no hi ha col·laterals formades, però que és probable que durant aquest estat, la hipòxia al mesenteric acabi portant a fenòmens d'angiogènesi que contribueixen tant a la formació de col·laterals com a la circulació hiperdinàmica²³.

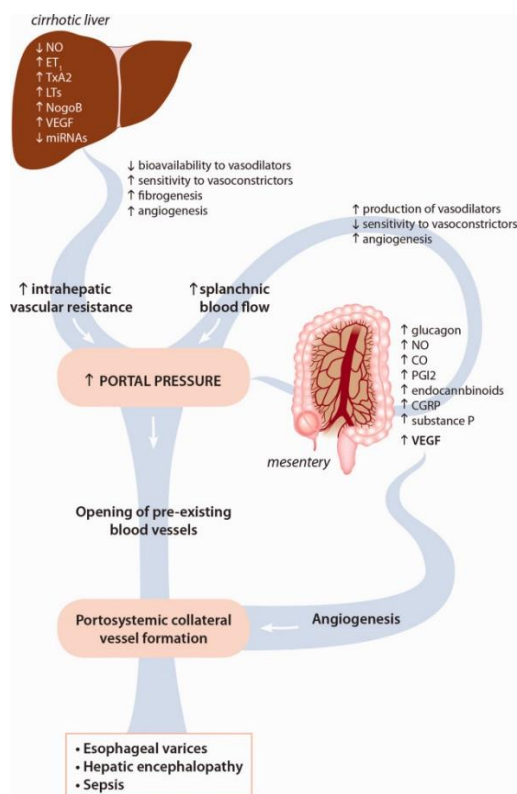


Figura 5: Fisiologia molecular de la hipertensió portal: mecanismes intra i extrahepàtics. Extreta de Fernández, M. *Molecular pathophysiology of portal hypertension*, Hepatology (2015)

La circulació hiperdinàmica esplàncnica en hipertensió portal i cirrosi s'associa característicament a la circulació hiperdinàmica sistèmica, on es dona una baixada de la pressió arterial i una resistència vascular perifèrica disminuïda i un increment del cabal cardíac (que no sol ser suficient per mantenir la pressió arterial). La vasodilatació perifèrica té un paper principal en l'activació de sistemes endògens neurohumorals que porten a la retenció de sodi, l'expansió del volum plasmàtic i l'acumulació de líquid ascític, que juntament amb la peritonitis bacteriana i les infeccions sistèmiques poden causar al pacient cirròtic una aturada multiorgànica²⁴. Perquè augmenta el flux sanguini esplànctic

ha estat motiu de molts treballs de recerca recentment. L'ús de models animals de cirrosi i hipertensió portal ben caracteritzats, ha permès esbrinar que l'increment de flux esplàncnic és en realitat un procés complex i multifactorial que inclou mecanismes diferents però complementaris: una vasodilatació arteriolar mesentèrica, una disminuïda resposta vascular als vasoconstrictors endògens (hipocontractilitat) i una formació i maduració de nous vasos formats per una activa angiogènesi²⁵ (Figura 5). Aquests mecanismes actuen conjuntament amb l'objectiu final d'incrementar el flux sanguini en els òrgans esplànquics. Per això seria interessant, des de el punt de vista terapèutic, aplicar teràpies combinatòries que atenuessin la formació de nous vasos però que també poguessin modular l'excessiva vasodilatació.

2.3.1 Vasodilatació arterial esplànquica

La vasodilatació arterial en les circulacions esplànquica i sistèmica és una característica important de la hipertensió portal. La primera d'elles incrementa el flux portal i exacerba la hipertensió portal. La vasodilatació arterial esplànquica s'atribueix a un anormal funcionament de les diferents capes que conformen el vas: la capa endotelial o íntima, la capa muscular i l'adventícia (la qual conté les terminacions nervioses) i hi trobem un bon nombre de molècules implicades.

2.3.1.1 Òxid nítric

L'òxid nítric és la molècula més rellevant que contribueix a aquesta vasodilatació esplànquica. Al contrari del que passa dins el fetge (on la producció d'òxid nítric és deficient), a la vasculatura esplànquica hi ha un increment en la síntesi d'òxid nítric degut a un augment en l'expressió i activitat de l'enzim eNOs. Això evidencia la coneguda paradoxa de la hipertensió portal: les mateixes vies, però que es comporten diferent segons territori/teixit i que suposa un repte a l'hora d'encertar amb el tractament: el que pot ser beneficiós i adequat per un territori pot resultar contraproduent en l'altre, i viceversa. Els

majors estímuls per l'enzim eNOs en hipertensió portal inclouen VEGF, l'estrès per lliscament i les citocines proinflamatòries. Les rates amb una mínima hipertensió portal ja expressen alts nivells de VEGF i òxid nítric al jejú²⁶, essent part d'aquest vasodilatador producte d'un increment dels nivells d'expressió d'eNOs mediat per VEGF; De fet, quan s'inhibeix la senyal de VEGF disminueixen nivells d'òxid nítric via eNOs. Ja havíem comentat que l'òxid nítric causa vasodilatació a través de l'estimulació de la guanyil ciclase per generar GMP cíclic en les cèl·lules musculars dels vasos. Però a més, l'òxid nítric contribueix a augmentar el flux esplàncnic afavorint l'angiogènesi²⁷. Per altra banda, estudis recents, descriuen un nou mecanisme per a la modulació d'eNOs en cirrosi, que implica al sistema renina-angiotensina (molt important en el control de la pressió arterial i la homeòstasi d'electròlits). En aquest cas l'angiotensina II, un vasoconstrictor generat per l'acció de l'enzim convertidor d'angiotensina (ACE) és transformat via ACE2 a Ang (1-7) un pèptid biològicament actiu i potent vasodilatador. S'uneix al receptor MasR, acoblat a proteïna G, i activa eNOs en cèl·lula endotelial (Figura 6). És sabut que en models animals de cirrosi hepàtica, l'expressió d'ACE2, Ang (1-7) i MasR està augmentada en artèries mesentèriques contribuint així doncs a la vasodilatació ja esmentada. A més, l'òxid nítric, contribuiria també a la regulació del flux limfàtic modulant la contractilitat de la cèl·lula muscular d'aquests vasos. Es coneix que en cirrosi, els vasos limfàtics del mesenterí tenen una eNOs incrementada i un menor recobriment de múscul llis (cosa que es pot revertir amb una inhibició de l'enzim eNOs)²⁸. Per tant cal remarcar la importància del sistema limfàtic en malalties hepàtiques.

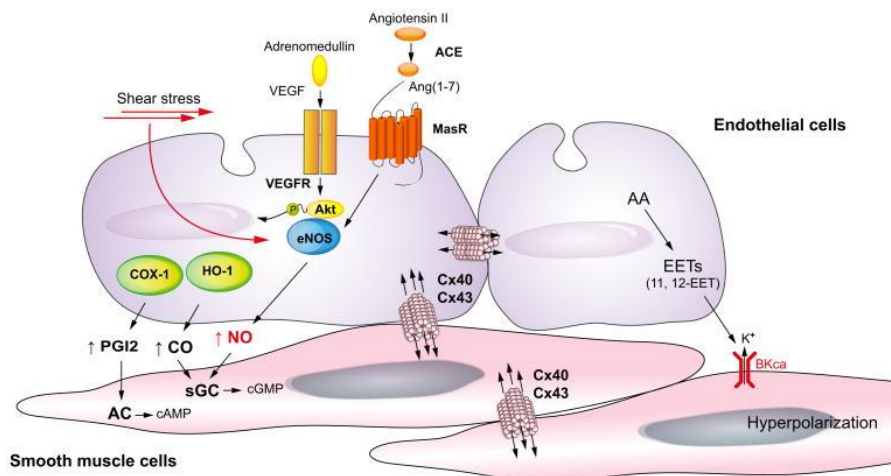


Figura 6: Mecanismes implicats en la vasodilatació arteriolar esplàncnica en cirrosi i hipertensió portal. Extreta de Iwakiri Y, *Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis*, J. Hepatology (2014)

2.3.1.2 Monòxid de Carboni (CO)

Similar a l'òxid nítric, el monòxid de carboni és una molècula gasosa endògena que augmenta la seva producció en hipertensió portal degut a la inducció de l'enzim productor: la hemooxigenasa 1 (HO-1). Concretament aquest enzim catalitza la conversió del grup hemo en monòxid de carboni + biliverdina + ió de ferro. El monòxid de carboni produeix vasodilatació esplàncnica i hiporeactivitat a molècules vasoconstrictores²⁹, i també facilita processos angiogènics. A més, HO-1 és un enzim induïble per estrès; al trencar el grup hemo minimitza els efectes prooxidants d'aquest grup i a més es generen biliverdina i el seu producte, la bilirubina, potents antioxidants i antiinflamatoris que eliminen radicals lliures. El ió de ferro, a més, facilita la síntesi de ferritina que també té propietats antioxidants. Encara no es coneixen els mecanismes concrets que fan augmentar els nivells de l'enzim HO-1 en hipertensió portal tot i que és probable que sigui multifactorial, ja que hi ha moltes molècules i vies rellevants en la hipertensió portal i que es coneix que activen

la transcripció de l'enzim HO-1 (citocines, endotoxines, estrès oxidatiu, estrès per lliscament...).

2.3.1.3 Prostaciclina

La prostaciclina és un prostanoide endogen derivat de la ciclooxygenasa d'endoteli que actua sinèrgicament amb l'òxid nítric afavorint la vasodilatació esplàncnica³⁰. Causa relaxació de la cèl·lula de múscul llis activant l'enzim adenilil ciclasa i en últim terme incrementant els nivells de l'adenosina monofosfat cíclica (AMPc). Els seus nivells augmenten fruit de la inducció de l'enzim ciclooxygenasa (COX) per diversos factors: estrès per lliscament, forces mecàniques, molècules proinflamàtòries i micropartícules (petites vesícules que van circulant per sang perifèrica i que s'originen de membranes plasmàtiques de cèl·lules endotelials, plaquetes, leucòcits i eritròcits).

2.3.1.4 Glucagó

El glucagó, secretat a l'alça en hipertensió portal per les cèl·lules alfa del pàncrees, té normalment metabolisme hepàtic i en aquest cas s'acumula en la circulació sistèmica degut al dany hepàtic i a la circulació portocol·lateral, que fa que s'escapi del pas hepàtic³¹.

2.3.2 Hipocontractilitat de la cèl·lula muscular llisa

A part de l'excés de vasodilatadors, una característica de la circulació esplàncnica i sistèmica de la hipertensió portal i cirrosi és una hipocontractilitat vascular: una disminuïda resposta dels vasos a substàncies vasoconstrictores. Per exemple se sap que hi ha una senyalització deficient de la via Rho-cinasa i una dessensibilització dels receptors a vasoconstrictors (per fosforilació i per unió a beta-arrestina), però també a una regressió de la innervació simpàtica en aquestes artèries³². A això se li suma la disminució en l'expressió de molècules vasoconstrictores com el neuropèptid Y, la Urotensina II,

l'angiotensina i la bradiquinina. En resum i al final, la contractilitat de la vasculatura mesentèrica queda compromesa durant el desenvolupament de la hipertensió portal²⁴.

No cal oblidar-nos que a part d'aquests fenòmens vasoactius, la hipertensió portal comporta un remodelat de la vasculatura mesentèrica. Models murins de cirrosi hepàtica confirmen que es produeixen canvis morfològics en les parets vasculars esplànquiques i sistèmiques; més concretament s'observa una disminució del gruix de la paret de les artèries³³. Aquest camp necessita més recerca, però fins al moment s'especula amb un increment de l'apoptosi de les cèl·lules musculars llises així com canvis en l'expressió de proteïnes importants per mantenir la integritat i la funció dels vasos. Al final, aquest aprimament de la capa vascular contribueix a augmentar la permeabilitat i facilitant l'aparició d'ascites i edema.

2.3.3 Neovascularització patològica a la hipertensió portal: tipus i regulació

Tradicionalment s'havia pensat que aquest desajust entre vasodilatadors i vasoconstrictors era l'únic factor responsable de l'increment de flux esplàncnic, i la formació de vasos portocol·laterals es considerava una conseqüència mecànica a l'increment de pressió venosa portal que finalment resultava en una obertura i dilatació de vasos preexistents entre les circulacions portal i sistèmica. No obstant, estudis recents han demostrat que la neovascularització patològica juga un paper molt important en la fisiopatologia de la hipertensió portal contribuint a l'augment del nombre de vasos al territori esplàncnic i a la formació dels vasos portocol·laterals³⁴. Els vasos col·laterals portosistèmics més rellevants i amb més importància en la hipertensió portal són les varius gàstriques i les esofàgiques. I són les responsables d'una de les complicacions més severes d'aquesta síndrome: el sagnat gastrointestinal agut. Però també són responsables de la derivació o "shunting" de la sang venosa portal cap a la circulació sistèmica que causa finalment encefalopatia hepàtica, empitjora el dany hepàtic, incrementa la susceptibilitat a sèpsia i a una exacerbació de la circulació hipercinètica amb les seves conseqüències.

De fet, s'ha demostrat que els nivells del factor de creixement vascular de l'endoteli VEGF, potent factor proangiogènic, es troben incrementats en òrgans esplàncnics d'animals amb hipertensió portal³⁵. I això va en paral·lel a una major expressió del marcador de cèl·lula endotelial CD31 així com el receptor 2 de VEGF, VEGFR-2. En relació amb això s'han estudiat diferents estratègies bloquejant la via de VEGF per intentar reduir aquesta angiogènesi patològica³⁶. També és cert que des del punt de vista clínic, el més rellevant seria poder revertir aquesta anormal vasculatura associada a la hipertensió portal. I per això seria convenient trobar estratègies que abordessin no només les fases més inicials i primerenques de la neovascularització, més depenents de VEGF, sinó les fases on es requereix una maduració d'aquesta vasculatura per a poder-la estabilitzar. Aquests processos, que es refereixen sobretot el recobriment de la nova capa endotelial per una capa de cèl·lules murals o perícits, estan en part regulats per la molècula PDGF: factor de creixement derivat de plaquetes³⁷. Els treballs basats en la inhibició d'ambdós factors proangiogènics (VEGF i PDGF), com per exemple amb el fàrmac Sorafenib (bloquejant multikinasa de VEGFR-2, PDGFR- β i Raf cinasa) han aconseguit reduir el grau de col·lateralització portosistèmica, la circulació hiperdinàmica esplàncnica, la fibrosi intrahepàtica i la pressió portal en models animals de cirrosi hepàtica i hipertensió portal, obrint les portes a noves estratègies terapèutiques^{38,39}. El que sí és cert es que els assajos clínics dirigits en aquest sentit han resultat poc esperançadors degut als efectes secundaris no desitjats com el dany endotelial, la extravasació i el risc de sagnat en pacients amb hepatocarcinoma, si bé és cert que hi ha algun estudi pilot on es demostrava que el Sorafenib disminuïa la pressió portal en pacients amb cirrosi hepàtica i hepatocarcinoma⁴⁰, obrint la porta a assajos clínics amb dosis més baixes. S'ha de tenir en compte que aquests tractaments inhibeixen inclús els nivells fisiològics de VEGF, que són necessaris per a la homeòstasi dels vasos o altres processos com la cicatrització o la reparació tissular, per bé que l'objectiu principal d'aquests tractaments era reduir la mida del tumor i per això es requerien dosis molt elevades dels inhibidors de cinases. Inclús en estudis amb animals, on es donava una dosi molt elevada per intentar revertir la fibrosi i cirrosi, aquests tractaments produïen un dany al fetge en forma de atròfia de les trabècules hepàtiques i

una èctasi (dilatació de la llum) del sinusoide que acaba congestionant el fetge⁴¹. Així que poder inhibir l'angiogènesi patològica solament afectant els nivells patològics i no els fisiològics ha de ser l'objectiu a aconseguir.

La neovascularització associada a la hipertensió portal és un fenomen complex i molt regulat, que val la pena descriure amb profunditat. La funció dels vasos sanguinis és aportar oxigen i nutrients a cada teixit i òrgan del cos, retirar-ne les substàncies de rebuig i proporcionar cèl·lules hematopoètiques per a la immunitat⁴². Tot i els beneficis que aporta a l'organisme tenir una extensa xarxa vascular pel creixement i regeneració dels teixits, és cert que la vasculatura pot potenciar processos d'inflamació o malignitat, com la metastasi de cèl·lules tumorals o la hipertensió pulmonar⁴³.

La formació de nous vasos sanguinis es pot donar per diferents processos; freqüentment ens hi referim amb el terme **angiogènesi**, però no sempre utilitzem correctament el mot. De manera estricta l'angiogènesi es refereix a la formació d'un vas nou a partir d'un preexistent mitjançant un nou brot, i que a la literatura es coneix amb l'anglicisme "sprouting" o "vessel branching".

Però hi ha mecanismes menys coneguts i menys estudiats que també participen en la creació de noves xarxes vasculars (Figura 7). La **intussuscepció** per exemple, és un procés intravascular de formació de pilars o columnes que separen la llum dels vasos petits i capil·lars i que acaba bifurcant-lo i duplicant-los. A diferència de l'"sprouting" on hi ha una degradació de la membrana basal i les cèl·lules endotelials "tip" es projecten cap a la matriu extracel·lular, en la intussuscepció les projeccions endotelials s'orienten cap dins la llum vascular⁴⁴.

En certs ambients, com els tumorals, es produeix el que s'anomena **coopció**, on les cèl·lules tumorals segresten i utilitzen la vasculatura preexistent enlloc d'induir nous processos angiogènics. També es pot donar el cas que les pròpies cèl·lules tumorals formin

uns canals lineals per on hi pot perfondre sang i que acabin anastomosant amb els vasos sanguinis preexistents. Aquest fenomen s'anomena **mimetisme vascular** perquè la cèl·lula tumoral es transforma per mimetitzar un tipus d'endoteli i rebre sang en absència d'angiogènesi⁴⁵. Tampoc cal obviar la **transdiferenciació** a cèl·lula endotelial o la **vasculogènesi**, a la que ens referirem més endavant.

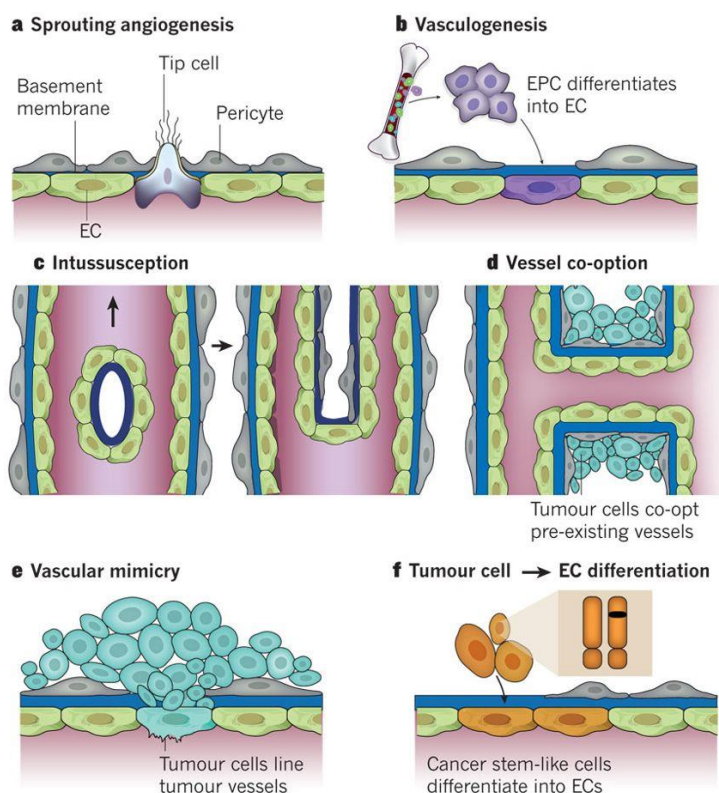


Figura 7: Diversos mecanismes per a la formació dels vasos sanguinis. Extreta de Carmeliet, P. *Molecular mechanisms and clinical Applications of angiogenesis* Nature, (2011)

2.3.2.1 Angiogènesi

Però sense dubte l'**angiogènesi**, o formació de nous vasos a partir dels ja preexistents és el fenomen més comú i com a conseqüència el més estudiat i reportat; Val la pena aturar-se i detallar-lo amb més profunditat. Artèries, arterioles, venes, vèdules i capil·lars són els tipus de vasos que conformen el sistema circulatori sanguini. Tant artèries com venes presenten 3 distintes capes mentre que els capil·lars solament estan formats d'una capa endotelial immersa en teixit connectiu (Figura 8).

La capa o túnica **íntima** és la capa més fina, i està formada per una línia contínua de cèl·lules endotelials, en contacte directe amb la llum del vas. La permeabilitat de l'endoteli és potser la seva característica més important ja que la funció final del vas és l'intercanvi de nutrients i gasos amb els diferents teixits. Embolcallant l'endoteli hi ha la capa o túnica **mitja**, formada per cèl·lules de múscul llis disposades de manera circular i integrades en teixit elàstic i connectiu. És la responsable de la contractilitat del vas. El gruix d'aquesta capa és diferent en venes i artèries, essent molt més gran en aquestes últimes ja que han de suportar i mantenir la pressió sanguínia. Per això la composició de la fibra també és diferent segons el tipus de vas; les venes són en general menys elàstiques que les artèries per aquest mateix motiu. La darrera capa és la túnica **adventícia** o externa, formada principalment per fibres connectives i alguna cèl·lula de suport. La seva funció principal és ancorar els vasos als teixits circumdants. El seu gruix pot ser més gran en les venes per prevenir que es col·lapsin i protegir-les de possibles danys (sobretot les que es localitzen més superficialment). Aquestes 3 capes es separen per les làmines elàstiques: la interna separa la capa íntima de la muscular i la externa separa la muscular de l'adventícia. Totes dues confereixen estabilitat al vas⁴⁶.

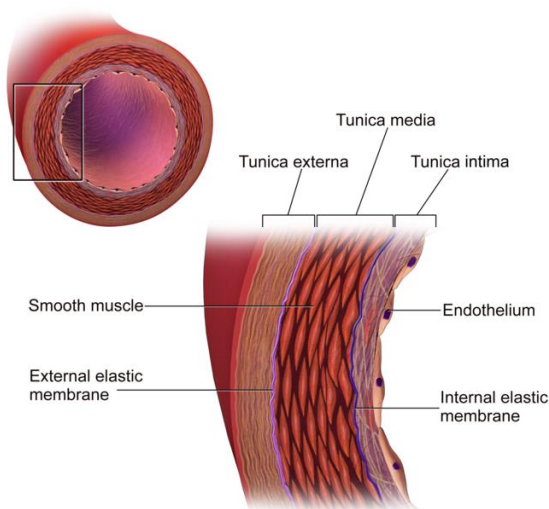


Figura 8: Estructura en capes dels vasos sanguinis. Extreta de Medical gallery of Blausen Medical (2014)

L'angiogènesi es dona tant en fenòmens fisiològics normals com en el transcurs de malalties, i es perllonga durant tota la vida de l'organisme, des de l'úter fins a la vellesa. En un adult les cèl·lules endotelials de la capa íntima es mantenen quiescents i amb una vida mitja llarga. Senyals autocrines com VEGF, NOTCH, angiopoietina-1 (ANG-1) o FGFs les mantenen en aquesta quiescència i protegides de certs insults⁴². Es troben interconnectades per molècules d'unió com les claudines o la cadherina d'endoteli vascular VE-cadherina i embolcallades per perícits que també envien senyals antiproliferatives i que ajuden per tant, a mantenir aquesta quiescència. Aquests dos tipus cel·lulars produeixen els components de la làmina basal interna, sobre la que descansen. Quan arriba una senyal proangiogènica (VEGF, Angiopoietina-2, FGF o quimiocines) alliberada en una situació d'hipòxia, inflamació o tumor, els perícits es desenganxen de la paret del vas en resposta a angiopoietina-2⁴⁷ i juntament amb les cèl·lules endotelials tipus "tip" o punta promouen la degradació proteolítica de la membrana basal mitjançant les metal·loproteïnases (MMPs).

La regulació d'aquestes proteïnases és essencial per a la formació del nou brot, ja que una excessiva degradació de matriu deixa un escenari pobre en matriu extracel·lular, indispensable per a acollir a la nova branca/ramificació del vas⁴⁸. La degradació de la matriu per part de les MMPs també allibera factors proangiogènics que solen estar segrestats a la matriu, com ara VEGF i FGF, però alhora també genera molècules antiangiogèniques que prevenen un excessiva ramificació o “branching” (Figura 9).

En aquest punt, i a més per les senyals proangiogèniques, les cèl·lules endotelials tip obren el camí del nou vas gràcies al seu fenotip mòbil i invasiu. Els seus prominents fil·lopodis són els guies que van dirigint el brot nou en direcció als ambients més rics en factors de creixement; les cèl·lules endotelials “stalk” són les que segueixen a les tip i són les que proliferen activament i allarguen el nou brot, formant una nova llum. A més, estableixen unions amb les cèl·lules veïnes (mitjançant VE-cadherina) i produeixen components de la membrana basal per assegurar la integritat del nou brot⁴⁹. Aquests brots nous o microvasos s'acaben d'establir quan les cèl·lules tip anastomosen amb els brots veïns fent una xarxa nova interconnectada.

Però perquè un vas esdevingui funcional i permeti el flux sanguini, ha de ser madur i estable. En la fase resolutiva de l'angiogènesi les cèl·lules endotelials adquireixen altre cop el seu fenotip quiescent o “falanx”, es restableixen les unions entre elles i es diposita altre cop matriu per formar de nou la làmina basal. L'alliberació de factors com ANG-1, PDGF-B o TGF- β promouen el reclutament, la diferenciació i l'adhesió dels perícits o cèl·lules murals, que recobriran aquest nou vas i li conferiran aquesta estabilitat necessària perquè el nou vas progressi en lloc que entri en regressió⁵⁰.

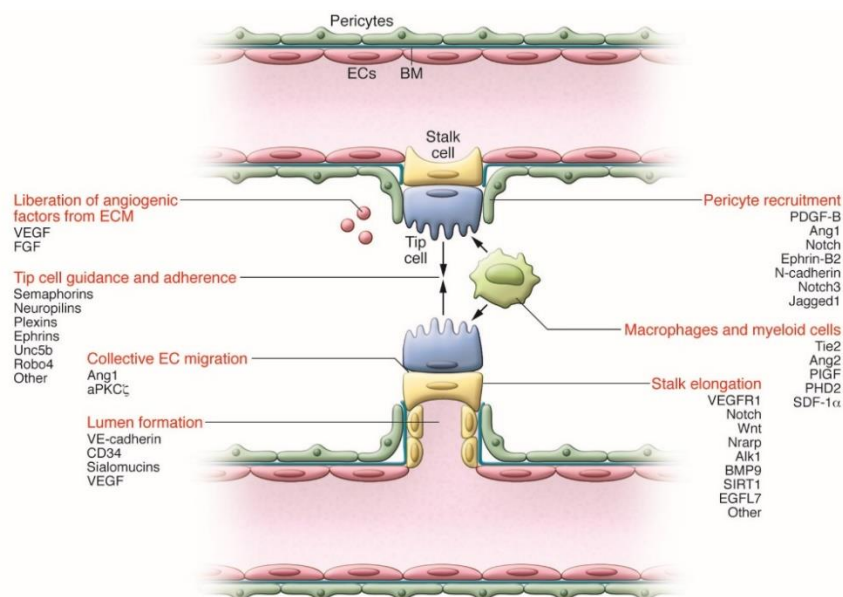


Figura 9: Detall de la formació d'un nou brot vascular: cèl·lules i molècules implicades. Extreta de Welte, J. *Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer*, J. of Clinical Investigation (2013)

Les vies de senyalització que controlen i regulen tot aquest procés tan complex i multifactorial són diverses i ben estudiades, i impliquen gran varietat de molècules. No només VEGF hi juga un paper, tot i que sí que té una funció de gran importància. Hi ha molècules implicades en el manteniment de la integritat de la vasculatura, com la família dels FGFs, i altres responsables del pas de vasculatura quiescent a angiogènica, com les angiopoietines, com ja havíem esmentat abans.

La via de senyalització de NOTCH, per exemple, es troba implicada en l'especificació de la cèl·lula endotelial cap als fenotips: migratori de les cèl·lules tip o proliferatiu de les cèl·lules stalk. L'activació de VEGFR-2 per part de VEGF promou la formació dels fil·lopodis i per tant el fenotip tip, i a més regula a l'alça l'expressió de la molècula DLL4 o Delta-like 4. Aquesta molècula és el lligand del receptor NOTCH, que

s'expressa primordialment en les cèl·lules veïnes stalk. La unió lligand-receptor activa NOTCH que alhora regula negativament els nivells de VEGFR-2 en aquesta cèl·lula stalk, essent menys sensible a respondre a VEGF i en general anul·lant el fenotip tip o migratori. I de fet això s'ha comprovat en experiments d'inhibició de NOTCH, on s'aprecia una excessiva ramificació durant el procés angiogènic, evidenciant que la cèl·lula que veritablement respon als estímuls angiogènics és la cèl·lula tip⁴². Paral·lelament les cèl·lules stalk sintetitzen la molècula JAG1 (JAGGED1), lligand de NOTCH també i que antagonitza la senyal residual de DLL4 en la cèl·lula tip. Aquest circuit és el que manté l'activitat diferencial de NOTCH en ambdós tipus cel·lulars i es coneix com inhibició lateral; és responsable de restringir el "branching" i afavorir la perfusió dels nous vasos (Figura 10). També participa en la maduració dels nous vasos: DLL4 activa la via de NOTCH a les cèl·lules murals, augmentant finalment els nivells del receptor de PDGF (PDGFR- β)⁵¹.

Així doncs: l'alliberació de les cèl·lules endotelials de la capa íntima en el front del brot, la seva migració guiada per un gradient de VEGF, la inhibició lateral de les cèl·lules tip, el manteniment del fenotip proliferatiu de les cèl·lules stalk, l'elongació i estabilització de la nova branca, la formació de la nova llum, la fusió d'aquesta nova branca amb un altre vas i la posterior perfusió, el retorn a la quiescència del vas consolidat, la maduració i remodelat del nou vas, o l'estabilització i reclutament de cèl·lules murals.... un procés complex, multifactorial i amb una gran quantitat de senyals, vies i molècules implicades, fan que l'angiogènesi sigui un fenomen altament regulat i prou important per ser estudiat a fons, amb la intenció de trobar eines terapèutiques que ajudin a atenuar els efectes adversos en un context patològic.

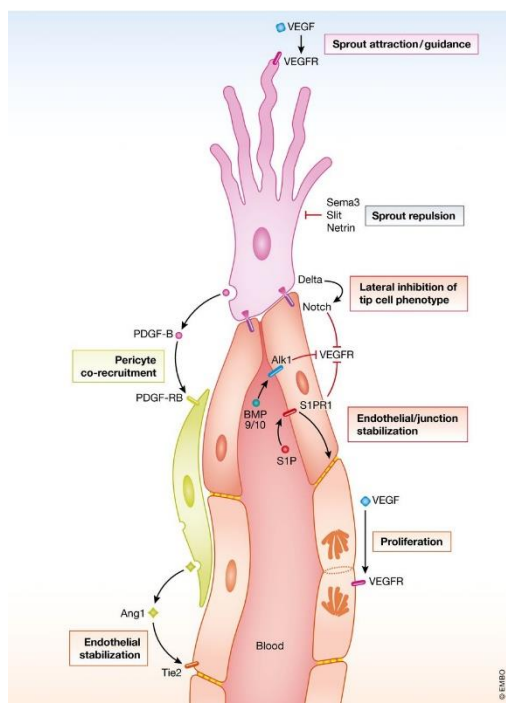


Figura 10: Senyalització cèl·lula-cèl·lula en angiògenesis. Extreta de Betsholtz, C. *Cell-cell signaling in blood vessel development and function*. EMBO Molecular Medicine (2018).

2.3.2.2 Cèl·lules mare i vasculatura: Vasculogènesi post-natal

L'angiògenesis i la vasculogènesi són els dos grans mecanismes encarregats de la formació de nous vasos, i tot i que sovint a la literatura es fan servir indistintament hi ha diferències clares entre tots dos processos. Com ja s'ha explicat abans, l'angiògenesis és la formació de vasos sanguinis nous a partir de preexistents mitjançant la proliferació de les cèl·lules endotelials madures, mentre que la vasculogènesi es refereix a la formació *de novo* de vasos sanguinis en l'etapa embrionària, fruit del reclutament de cèl·lules mesodèrmiques multipotents que, transdiferenciades a cèl·lula endotelial s'organitzen formant un vas sanguini nou⁵². Aquestes cèl·lules, precursors de la cèl·lula endotelial

s'anomenen angioblasts i contribueixen a la vasculogènesi primer formant uns agregats que després s'elonguen donant lloc a estructures tubulars i que finalment s'organitzen en una xarxa tipus capil·lar.

En mamífers, la vasculogènesi es dona en paral·lel amb l'hematopoesi o formació de cèl·lules sanguínies. I de fet hi ha molts estudis que defensen la idea que podrien compartir un progenitor comú, l'hemangioblast. En aquest tema hi ha força controvèrsia, i sigui cert o no, el fet és que ambdós llinatges comparteixen diversos factors reguladors de la seva diferenciació. És el cas de VEGF, produït per l'endoderma del sac vitel·lí i que activa el receptor VEGFR-2 dels precursors mesodèrmics (Figura 11). VEGF també és important per a la posterior proliferació, migració i coalescència d'aquestes cèl·lules endotelials formant un plexe capil·lar primitiu⁵³. Pel que fa a les cèl·lules murals o perícits, s'ha vist que tenen propietats progenitores tant en teixits embrionaris com adults. Es descriuen com cèl·lules mesenquimals que poden ser reactivades després de dany o en context de malaltia⁵⁴.

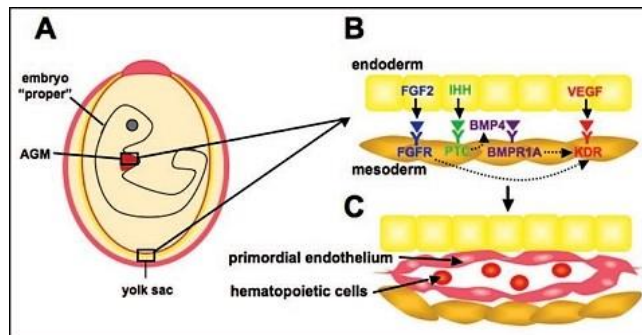


Figura 11: Regulació molecular del remodelat vascular i especificació hematopoètica durant el desenvolupament embrionari murí. Extret de Goldie, L.C. *Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification*, Organogenesis (2008)

La vasculogènesi postnatal o en teixits adults es refereix a la formació de nous vasos sanguinis a partir de cèl·lules progenitores residents als vasos preexistents o bé potencialment circulants. És un fenomen que ha centrat molta recerca en els últims anys; la troballa de cèl·lules progenitores endotelials (EPC) en circulació provinents del moll de l'os, capaces de participar en fenòmens de neovascularització ha obert aquest camp a una intensa investigació i al debat. És cert que aquest fet ocorre però el grau d'aquesta contribució és el que genera més controvèrsia. No hi ha evidències que les EPC provinents del moll de l'os contribueixin estructuralment a l'endoteli tumoral, per exemple, tot i que podrien contribuir-hi paracrinament, generant factors que afavorissin la formació de nous vasos⁵⁵. També s'ha vist en algun estudi que les cèl·lules endotelials poden, en un context patològic, desenganxar-se de les seves cèl·lules veïnes i adquirir un fenotip mesenquimal, un fenomen conegut com a transició d'endoteli a mesènquima (EndMT)⁵⁶.

Un altre aspecte a tenir en compte en la vasculogènesi postnatal és l'existència de nínxols especialitzats de cèl·lules mare o progenitores en diversos òrgans i/o teixits. És sabut que en altres territoris hi ha nínxols de cèl·lules mare o progenitores que es mantenen en quiescència, com a reservori per a futures situacions on es puguin demandar. És el cas del moll de l'os, potser el més estudiat i caracteritzat, on les cèl·lules hematopoètiques romanen quiescents en un nínxol osteogènic i on la vasculatura n'és molt important ja que ajuda a configurar un microambient específic per a mantenir la supervivència de les cèl·lules mare tot controlant l'equilibri entre autorenovació i diferenciació, quiescència i proliferació, adherència i mobilitat, quimioatracció i retenció i mobilització en condicions patològiques⁵⁷. I això s'ha vist també en altres territoris com per exemple el sistema nerviós central. Allí les cèl·lules mare neurals estan íntimament en contacte amb els vasos sanguinis, i al menys "in vitro" s'ha demostrat que les cèl·lules endotelials poden augmentar la capacitat autoregenerativa o "self-renewal" d'aquestes cèl·lules mare neurals via el receptor NOTCH.

En el cas de la vasculatura sanguínia també podríem parlar de **nínxol** de cèl·lules mare i/o progenitores en les diferents capes del vas. Les cèl·lules predominants en les 3 capes estan ben caracteritzades: les cèl·lules endotelials a la íntima, les musculars llises a la capa mitja i els fibroblasts a la capa adventícia, però fins ara no se sabia gaire res sobre grups de cèl·lules addicionals dins aquestes capes. Estudis recents han ajudat a identificar poblacions de cèl·lules progenitores en les diferents capes dels grans vasos, però és la capa adventícia, la més externa, la que es considera veritablement nínxol vascular de cèl·lula mare. Aquest concepte neix per la prominent expressió de marcadors de cèl·lula mare en aquesta capa: CD34, stro-1, c-kit, NOTCH-1, Oct-4, Sca-1 i Flk-1. Hi resideixen les diferents poblacions de cèl·lules progenitores de diferent llinatge (endotelial, muscular o inclús macròfag) compartint espai també amb cèl·lules madures. Però la confusió que aporten els marcadors, que sovint coincideixen en diferents llinatges i que també fluctuen quan es posen en cultiu no permet acabar de caracteritzar bé les diferents subpoblacions així com la seva organització jeràrquica, els mecanismes responsables de la seva activació, diferenciació, i mobilització del seu particular microambient. Tampoc hi ha massa descrit sobre el paper regulador en el nínxol d'altres poblacions cel·lulars de la paret vascular: fibroblasts de l'adventícia, adipòcits perivasculars, cèl·lules inflammatòries residents i inclús neurones.

En la última dècada, han anat apareixent treballs on es posava de manifest la presència d'un ampli espectre de cèl·lules mare i/o progenitores en la paret vascular així com la seva possible contribució en processos patològics⁵⁸. Potser la població més estudiada és la de les cèl·lules progenitores endotelials o EPC. Amb característiques fenotípiques de cèl·lula mare, habilitat per a l'expansió clonal, adherència a molècules de la matriu i capacitat per diferenciar-se a cèl·lules endotelials madures, les EPC expressen una sèrie de molècules que es consideren característiques d'aquesta població i que s'utilitzen com a marcadors. CD34, AC133, Flk-1 o KDR, Tie-2 o el lligand per a la lectina UEA-1 són algunes d'aquestes molècules però cal destacar la controvèrsia que trobem a la literatura en aquest aspecte degut a la presència d'aquestes molècules també en les

cèl·lules mare hematopoètiques o HSC. La hipòtesi que defensa l'existència d'un endoteli hemogènic postnatal, a manera del que hi ha en l'etapa embrionària, només afegeix confusió i ambigüitat, ja que fins ara no ha estat provada. Així que el mot EPC hauria de ser estrictament reservat a les cèl·lules progenitores molt compromeses ja en el llinatge endotelial i que cap cas expressaran marcadors de llinatge sanguini⁵⁹.

El que sí que sembla bastant clar, però, és l'existència de cèl·lules progenitores endotelials residents a la paret vascular dels vasos, com un nínxol independent del moll de l'os per aquest tipus cel·lular (Figura 12). S'hipotetitza que es localitzen a la **zona vasculogènica**, entre la capa muscular i l'adventícia⁶⁰. Aquestes cèl·lules serien positives per als marcadors CD31, CD105, CD141, CD146, CD144 i VEGFR-2 i es trobarien intercalant la resta de cèl·lules endotelials, formant part d'una subpoblació diferent però amb potencial clonogènic. En artèries coronàries humanes s'han trobat grups o "clústers" petits de cèl·lules progenitores VEGFR-2+, cKit+, CD45- al llarg de les 3 capes del vas i que podrien diferenciar-se a cèl·lula endotelial, cèl·lula muscular i en part a cardiomiòcit, i capaces d'incorporar-se a la nova vasculatura formada en un context patològic com podria ser una estenosi. També recentment s'ha identificat una subpoblació progenitora tipus "side population" a la superfície dels vasos sanguinis, CD31+ CD45- i amb capacitat d'excloure el colorant Hoechst, que representa només l'1% de les cèl·lules CD31+ i que tot i el seu estatus quiescent tenen alta capacitat proliferativa, poden formar colònies, i inclús poden donar lloc a nova vasculatura en ambients isquèmics⁶¹.

S'havia especulat que aquestes cèl·lules endotelials progenitores es trobaven en una zona vasculogènica situada en la capa més exterior, l'adventícia. I tot i que sembla provat que aquesta capa és rica en cèl·lules progenitores, és difícil poder diferenciar les EPC de la resta de progenitors proangiogènics amb característiques hematopiètiques o mesenquimals que hi cohabituen (i que per exemple poden arribar a fer tubulogènesi en assajos com el matrigel)⁶².

Per últim només mencionar la possibilitat que les cèl·lules endotelials puguin transdiferenciar-se a un fenotip mesenquimal; *in vitro* sí que s'ha vist que es poden convertir en cèl·lules de múscul llis, però falten estudis que ho puguin demostrar *in vivo* així com les vies per les quals es produeix aquest fenomen.

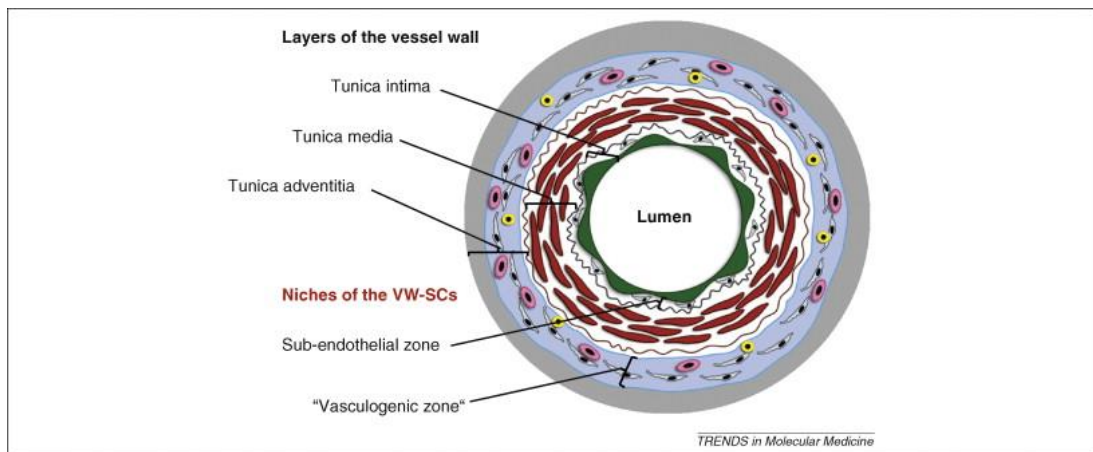


Figura 12: Sub-poblacions de cèl·lules mare i progenitores residents a la paret vascular en l'espai sub-entel·lial i a la zona vasculogènica de l'adventícia. Extreta de Tilki, D. *Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease*, Trends Mol Med. (2009)

També hi ha evidències que demostren l'existència de cèl·lules progenitores per a les cèl·lules del múscul llis (SMC) que conformen la capa mitja o muscular i que són les responsables d'aportar estabilitat mecànica al vas i regular el to vascular; en un principi es va descriure un possible origen circulant provinent del moll de l'os, com en el cas de les endotelials, però la seva contribució real i sobretot a llarg termini es pot considerar negligible. L'origen local, dins la paret vascular, de les cèl·lules progenitores de múscul llis (SPC) està demostrat a dia d'avui; estan compromeses en el llinatge muscular però no expressen marcadors de cèl·lula diferenciada com l'alfa-actina de múscul llis (α -SMA), la

SM-calponina, la SM22 α o la cadena pesada de la miosina (Myh11)⁶³. I tot i que no existeix un marcador específic de cèl·lula progenitora muscular, es fa servir àmpliament l'antigen de cèl·lula mare (Sca-1) per a identificar-les, sobretot a la capa adventícia. Estudis de traçabilitat han determinat un origen no hematopoètic d'aquestes cèl·lules, tot i expressar el receptor de superfície CD34 i han ajudat a dibuixar aquesta zona vasculogènica ja mencionada, i situada dins la capa adventícia dels vasos sanguinis.

També s'ha descrit una "side population" dins la capa mitja/muscular dels vasos, amb bipotència per diferenciar-se tant a cèl·lula endotelial com a cèl·lula muscular però sense capacitat hematopoètica (Figura 13).

Altres subtipus de cèl·lules mare/progenitores descrits com a resident en les capes del vas són els perícits i les cèl·lules mesenquimals (MSC). Sovint confosos entre ells i amb certa controvèrsia amb els marcadors que les identifiquen i/o que les distingeixen, sí que convergeixen en algunes característiques i el cert és que certes subpoblacions de perícits aïllats i separats de les seves EC veïnes adopten certes propietats mesenquimals, com la morfologia fusiforme, la capacitat autoregeneradora o la diferenciació a múltiples llinatges típicament descrita per a les mesenquimals (adipòcit, condrocit i osteoblast).

La literatura ofereix teories diverses sobre l'origen d'ambdós tipus cel·lulars, així com la seva localització i relació dins la paret vascular, però sí que sembla clar que són progenitores reclutades per convertir-se en cèl·lules de múscul llis.

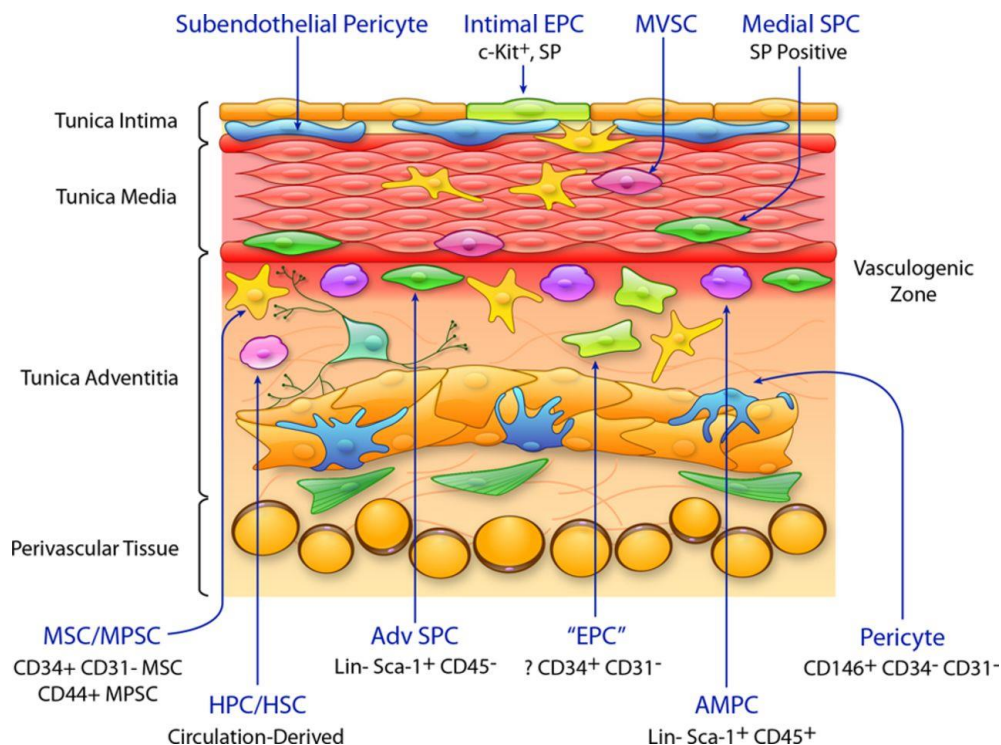


Figura 13: Distribució de les cèl·lules progenitores vasculars en les diferents capes del vas. Extret de Psaltis, P.J. *Vascular wall progenitor cells in Health and disease*, Circulation Research (2015)

Pel que fa al rol d'aquestes cèl·lules en la patogènesi de diverses malalties hi ha molta especulació. Com contribueixen a la iniciació, acceleració o perpetuació dels estadis patològics, relacionats amb la pròpia integritat vascular o l'angiogènesi continua essent un misteri. En el cas de la vascularització associada a tumor hi ha hagut molta recerca basada en el paper de les EPC circulants, però el cert és que la seva contribució final seria poca. No obstant, les senyals proangiogèniques alliberades pel tumor mobilitzarien les EPC residents que s'activarien i promourien el fenomen de cooptació o formació d'un nou vas durant el creixement i expansió d'un tumor. La vasculatura tumoral seria resultat d'una barreja de cèl·lules madures i progenitores, circulants i residents⁵⁹.

El mateix passa en la vascularització de les plaques d'ateroma en l'aterosclerosi. Els estudis d'irradiació del moll de l'os, que ajuden a esbrinar la contribució de les cèl·lules progenitores circulants, evidencien que la major part de cèl·lules que formen la capa neoíntima no són circulants⁶⁴, cosa que assenyala a les residents com a responsables d'aquest engruiximent. En aquest cas l'adventícia també hi juga un paper de gran importància; és allí on es troben els *vasa vasorum*, la xarxa microvascular que nodreix als propis vasos i que en un context patològic accelera el desenvolupament de la placa d'ateroma afavorint l'arribada de cèl·lules inflamatòries amb un paper paracrí molt important. També hi ha molts estudis que apunten a la mobilització de les EPC de l'adventícia cap a la íntima però no acaba de quedar clar si contribueixen directament a la formació de la placa o bé si hi tenen un paper tan sols accessori. Per tant, fins que no s'aprofundeixi en el rol i la funció de les cèl·lules progenitores en els teixits sans i en patologia i s'esbrini quins són els mecanismes que en regulen la seva activitat, no es podrà avançar en la possibilitat d'utilitzar-les terapèuticament en contextos patològics.

2.3.2.3 Mecanismes reguladors de l'angiogènesi patològica: VEGF

Ja hem esmentat que l'angiogènesi és un fet crític i clínicament molt rellevant en el desenvolupament de la hipertensió portal i la malaltia crònica del fetge, ja que participa en l'increment del flux esplàncnic i en la col·lateralització portosistèmica. Tots dos processos van de la mà, en cooperació, per mantenir i perpetuar la síndrome de la hipertensió portal. El mateix VEGF que regula el desenvolupament dels vasos col·laterals i les varius modula l'increment de l'enzim eNOS que promou la vasodilatació esplàncnica, tal i com hem subratllat anteriorment. Probablement una hipòxia inicial i un estrès a la paret dels vasos degut a la pròpia pressió, porten a una sèrie de fets seqüencials que indueixen un estat hiperdinàmic. Tots aquests fenòmens actuen sinèrgicament mantenint i agreujant la síndrome de la hipertensió portal.

Durant molt temps el paper de VEGF en la regulació de l'angiogènesi ha estat molt estudiat i reportat. I si bé és cert que l'angiogènesi és un fenomen molt complex on es donen diferents processos altament coordinats i regulats per diversos factors, la senyalització per part de VEGF és un pas crític en la angiogènesi fisiològica i també és molt important en la patològica⁶⁵.

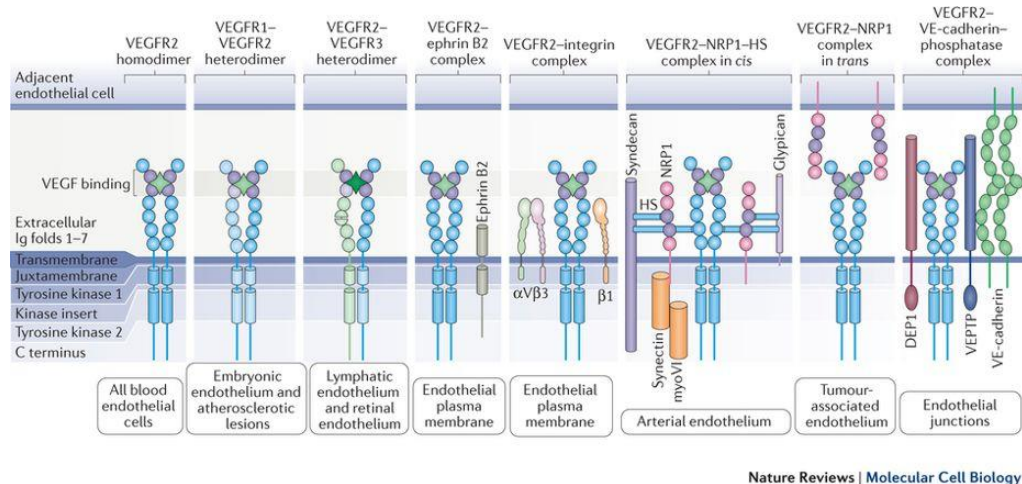
VEGF pertany a una família de proteïnes que inclou VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D a més de PlGF, però és la VEGF-A la més reportada degut al seu paper clau en la regulació de la formació de vasos sanguinis. VEGF-C i D regulen l'angiogènesi limfàtica⁶⁶. VEGF és principalment un mitògen de cèl·lula endotelial i això s'ha demostrat tant *in vivo* com *in vitro* a través de tota la via de senyalització de la fosfoinositol- 3-cinasa (PI-3K) i Akt; i a més té un efecte antiapoptòtic ja que indueix la síntesi de Bcl-2 i A1 en aquestes cèl·lules⁶⁷. A més, VEGF també és responsable de l'augment de permeabilitat vascular, vasodilatació i inclús s'ha demostrat que indueix l'aparició de fenestres en cèl·lula endotelial d'alguns llits vasculars⁶⁸.

Existeixen 4 isoformes diferents de VEGF-A degut a l'splicing alternatiu dels exons del seu gen: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆, essent les més predominants les VEGF₁₆₅ i VEGF₁₂₁. Aquesta última és una isoforma que no s'uneix a heparina i això fa que difongui fàcilment, en canvi les isoformes VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆ s'uneixen amb gran afinitat a l'heparina i per això és queden "segrestades" a la matriu extracel·lular. VEGF₁₆₅ presenta propietats intermèdies: parcialment secretada i parcialment lligada a matriu. És la isoforma biològicament més activa i potent^{65,69}.

VEGF s'uneix a dos receptors tirosina cinasa (RTK): VEGFR-1 i VEGFR-2. Ambdós presenten 7 dominis tipus immunoglobulina exposats a la matriu extracel·lular, una regió transmembrana i una seqüència consens tirosina cinasa intracel·lular. VEGFR-3 és un membre d'aquesta família de RTK però no uneix VEGF-A, sinó VEGF-C i D. A més, VEGF-A interacciona amb diversos coreceptors com les neuropilines (NRP1 i NRP2) i els Heparan

sulfate proteoglicans (HSPGs). Ens centrarem en descriure el receptor 2 de VEGF (VEGFR-2) ja que senyalitza tots els efectes coneguts d'aquest factor de creixement. I per aquest motiu ens centrarem en l'activació canònica d'aquest receptor, és a dir mitjançant el seu lligand clàssic: el VEGF⁷⁰. Convé destacar, no obstant, que existeixen vies no canòniques d'activació de VEGFR-2 que impliquen molècules com les bone morphogenetic proteins (BMP), els antagonistes gremlin (GREM1) o inclús forces mecàniques com l'estrès per lliscament (shear stress). Tot i que la principal via de senyalització sigui per VEGF no cal menysprear aquestes vies alternatives ja que en alguns casos s'uneixen al receptor amb una afinitat comparable al lligand clàssic⁷¹.

En la via canònica d'activació de la via de VEGF, el lligand s'uneix al seu receptor i n'indueix la seva dimerització. A conseqüència d'aquesta unió i posterior dimerització es produeix un canvi en la configuració del domini transmembrana que fa rotar el dímer i que és crític per una activació total del domini cinasa⁷². Tal i com es mostra a la figura 14 es poden formar homodímers (2 molècules de VEGFR2) o heterodímers (VEGFR-2 en combinació amb VEGFR-1 o 3), i mitjançant les autofosforilacions de diferents residus del domini intracel·lular poden variar les vies de senyalització posteriors.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 14: Estructura de VEGFR-2 i els seus complexos de senyalització. Extreta de Simons, M. *Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling* Nature Reviews (2016).

Els coreceptors de VEGFR-2, principalment les neuropilines NRP1 i NRP2 són de gran importància igualment en l'activació de tota la via i poden modular la senyalització d'aquest receptor tant quantitativament com qualitativament⁷³. VEGF s'uneix simultàniament a les NRPs i al VEGFR-2 en les cèl·lules endotelials, induint la formació de complexos NRP-VEGFR. Per exemple, NRP1 juga un paper clau en el trànsit intracel·lular de VEGFR-2: guia la translocació per endosomes de VEGFR-2 essent crucial per l'activació de ERK1/2, una de les vies de senyalització més importants. I el mateix passaria per a altres vies de senyalització de VEGF-A com ara la via p38 MAPK⁷⁴. I en canvi, en casos en què NRP1 s'uneix al complex VEGFA-VEGFR-2 en el domini *trans*, el complex acaba retintut a la superfície de la cèl·lula endotelial, sense internalitzar-se i suprimint l'angiogènesi⁷⁵.

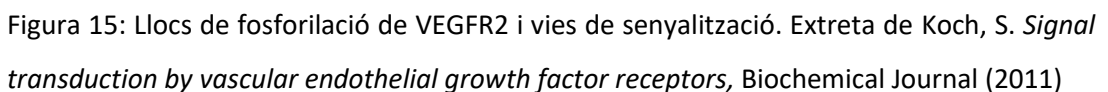
Uns altres col·laboradors molt importants de VEGFR-2 són les integrines, particularment les integrines $\beta 1$ i $\beta 3$. VEGFA promou l'associació de VEGFR-2 amb la integrina $\beta 3$, cosa que indueix la fosforilació d'un residu tirosina de la integrina $\beta 3$ i alhora

activa VEGFR-2. Les isoformes de VEGFA que s'uneixen a la matriu extracel·lular (VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆) promouen no obstant la formació del complex VEGFR-2-integrina $\beta 1$, que modifica la localització de VEGFR2 en la superfície de la cèl·lula i el fa saltar fins a les adhesions focals on s'activa de manera perllongada⁷⁶.

Les vies de senyalització de VEGFR-2 un cop activat són diverses, complexes i alhora molt estudiades (Figura 15). La via de PLC γ -ERK1/2 n'és una de les més rellevants i regula la proliferació i migració de la cèl·lula endotelial, el perfil específic de la cèl·lula endotelial arterial i la homeòstasi. La fosforilació del residu Y1173 és la responsable d'activar tota la cascada de senyalització activant la PLC γ que permet l'alliberació del Ca²⁺ del reticle endoplasmàtic i això finalment regula positivament la cascada RAF1-MEK-ERK1/2. El Ca²⁺ és igualment important per a l'activació de les proteïnes NFAT (nuclear factor of activated T cell). Aquestes proteïnes redueixen els nivells de VEGFR-1, fet que fa augmentar la biodisponibilitat de VEGFA i potencia així la senyalització de VEGFR-2⁷⁷.

Una altra via de senyalització de VEGFR-2 molt important és la que implica els enzims PI3K-AKT. AKT1 és la isoforma predominant implicada en angiogènesi en l'adult així com en la maduració vascular i metabolisme, via el complex mTOR. Breument, la fosforilació Y949 de VEGFR-2 permet l'activació de les cinases de tirosines citoplasmàtiques (SRC) que són les responsables, més avall, de que es generi el segon missatger fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP₃) que activa AKT i en últim terme promou la transcripció de gens relacionats amb la supervivència cel·lular o la permeabilitat vascular (s'activa eNOs i indueix òxid nítric que acaba induint vasodilatació en les cèl·lules musculars llises adjacents)⁷⁸.

També en relació amb les proteïnes SRC, destacar que VEGFR-2 és capaç d'activar la via de p38 MAPK tot i que no s'ha acabat de desxifrar ben bé el mecanisme. Però l'activació d'aquesta via té nombrosos efectes en la cèl·lula endotelial, com l'angiogènesi induïda per estrès per lliscament, la migració, la supervivència i la permeabilitat. La via de p38 MAPK requereix NRP1 i Ca²⁺, tot i ser independent de PLC γ . El Ca²⁺ intracel·lular activa



61

Sovint les vies de senyalització solen dibuixar-se com cascades lineals independents les unes de les altres i la realitat és molt complexa: les diferents vies convergeixen i es regulen entre elles mitjançant “loops” de retroalimentació positiva o negativa.

2.3.2.4 Mecanismes reguladors de l'angiogènesi patològica: regulació de VEGF per les proteïnes CPEB

L'angiogènesi patològica promoguda pels alts nivells del factor de creixement VEGF és importantíssima per la progressió, desenvolupament i manteniment de la hipertensió portal.

Fins ara els beneficis aportats per les drogues antiangiogèniques són encara minsos degut als seus efectes adversos que inclouen el col·lapse de la vasculatura normal, la extravasació vascular o el sagnat que es troben per exemple pacients amb càncer hepatocel·lular o cirrosi hepàtica. I això és degut a que els tractaments en ús no són selectius per a bloquejar la producció “patològica” de VEGF; Des del punt de vista terapèutic sí que seria interessant poder conèixer quins són els mecanismes reguladors dels nivells de VEGF, per tal de poder interferir tan sols en la senyal patològica de VEGF sense que això repercutís en la fisiològica, evitant així els efectes adversos⁸⁰.

La regulació transcripcional dels nivells de VEGF ha centrat la recerca sobre aquest factor, però és cert que hi ha hagut altres línies d'estudi que han assenyalat també la importància dels mecanismes traduccionals, per exemple modulats per proteïnes d'unió al RNA i microRNAs, que fan la seva funció en les regions no traduïdes (UTR =untranslated regions) del ARN missatger de VEGF⁸¹. Per exemple és conegut que diversos reguladors negatius com el complex GAIT, elements rics en AU i llocs diana per a micro RNA mantenen els nivells de missatger de VEGF silenciats, quan la síntesi d'aquest factor no és necessària

(reprimint la traducció i/o reduint la vida mitja del transcrypt). Fins fa poc, el mecanisme pel qual el transcrypt de VEGF aconseguia readenilar-se i tornar a ser actiu en un context d'angiogènesi patològica seguia sent un misteri, però recentment ha aparegut un estudi molt complert que aboca una mica de llum en aquest aspecte, i aporta un nou enfoc en la regulació d'aquest factor tant important en aquesta patologia⁸².

Però abans d'aprofundir en aquests mecanismes valdria la pena introduir d'una manera general la regulació de la traducció de proteïnes.

La traducció és un procés altament regulat que es dona al citoplasma de les cèl·lules, i que es divideix en 3 etapes: iniciació, elongació i terminació. Només ens centrarem en la iniciació, doncs n'és el pas més limitant. La iniciació està regulada per una gran quantitat de factors que s'uneixen a una regió concreta situada a l'extrem 5' del mRNA i que es coneix com "cap". El "cap" o 7-methyl-guanine nucleòtid confereix estabilitat a aquests mRNA nuclears i permet que s'hi uneixin els factors responsables de la iniciació de la traducció. De tots ells, el complex eIF4F o factor iniciador de la traducció eucariota n'és el més crucial, i està compost pels factors eIF4A, eIF4E i eIF4G. De manera breu i resumida, assenyalar que eIF4E s'uneix al "cap" 5' directament i allí interacciona amb eIF4G, que és considerat un factor d'acoblament, responsable de la unió al factor eIF3 que serà el que finalment recluta la subunitat 40S del ribosoma i així pot començar la traducció del mRNA a proteïna⁸³.

És sabut que la major part del control sobre la traducció es dona en aquest primer pas d'iniciació, ja que és crítica la unió de la subunitat 40S al missatger; En són responsables les proteïnes conegudes com eIF4E inhibitory proteins o 4E-BP (4E-binding proteins), que segresten el factor eIF4E i n'impedeixen la unió al eIF4G, i bloquejant tot l'acoblament posterior del complex. En concret, la 4EBP1, que és la més estudiada de les 3, no s'uneix de manera específica a cap mRNA concret i inhibeix la traducció d'aquells mRNA que normalment requereixen alts nivells de eIF4E⁸⁴. Aquesta família de proteïnes estan

molt ben estudiades i són importants reguladors de processos com el creixement cel·lular, el desenvolupament i inclús la progressió tumoral.

També es coneix que l'activitat de les 4EBP és sota control de la via de mTOR (Figura 16); la cinasa FRAP/mTOR fosforila 4EBP fent que aquesta es dissociï de eIF4E, alliberant-lo i permetent així que es formi de nou tot el complex eIF4 i per tant promovent la traducció de proteïnes. La inhibició específica de la cinasa mTOR per part de la Rapamicina impedeix aquesta hiperfosforilació de 4EBP, bloquejant finalment l'inici de la traducció de proteïnes, i per tant actuant com una droga anticancerosa^{85,86}.

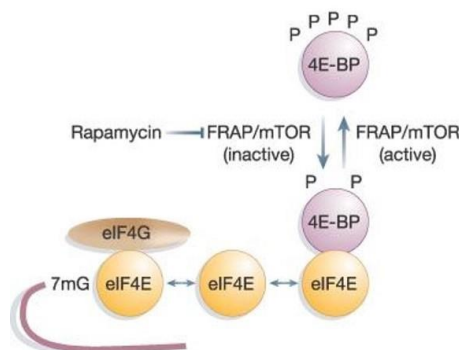


Figura 16: Regulació de les proteïnes 4E-BP per hiperfosforilació. Adaptada de Richter J.D *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins*, Nature (2005)

Però tal i com havíem introduït, aquest no és l'únic mecanisme regulador de l'inici de la traducció proteica. La família de proteïnes CPEB (cytoplasmatic polyadenylation element binding proteins) són un altre tipus de proteïnes reguladores de la traducció, però en aquest cas específiques de certs ARNm ja que s'uneixen a unes seqüències curtes, les CPE (cytoplasmatic polyadenylation elements), situades a l'extrem 3' de la regió no traduïda dels ARNm o UTR. I a la vegada, les CPEBs interaccionen amb Maskin, una proteïna que en últim terme impedeix l'inici de la traducció interrompent la unió de eIF4E amb eIF4G⁸⁷. Per tant, el complex **CPEB-Maskin-eIF4E** inhibeix específicament la traducció

dels missatgers que contenen seqüències CPE i que corresponen aproximadament al 20% dels mRNA de la cèl·lula. Maskin, en aquest cas actuaria com a 4EBP, però solament dels mRNA que contenen CPE (Figura 17).

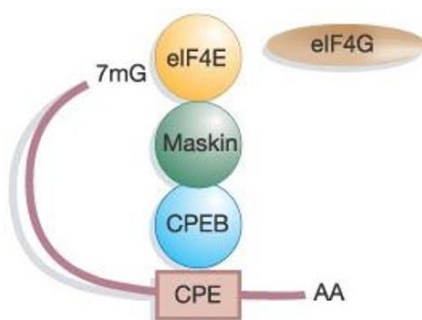


Figura 17: Control traduccional per les proteïnes 4EBP. Adaptada de Richter J.D *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins*, Nature (2005)

CPEB és una família que consta de 4 proteïnes integrants i que es va descobrir en oòcits de *xenopus* regulant la traducció de proteïnes implicades en meiosi, tot i que després s'ha vist que en cèl·lules de mamífers també regula la mitosi. En la cèl·lula eucariota la majoria de mRNA surten del nucli amb una cua llarga d'adenines o cua poly(A) que té una mitja d'entre 150-200 nucleòtids. Aquesta estructura promou l'exportació del ARNm cap al citoplasma, el protegeix de degradació per part de exoribonucleases i en facilita la traducció. Depenent de la seqüència i/o del tipus cel·lular els mRNA poden traduir-se immediatament quan entren al citoplasma o poden emmagatzemar-se en un estadi dorment fins que es reactivi la seva traducció. Els oòcits dels vertebrats són un tipus cel·lular on s'emmagatzema gran quantitat de ARNm inactius, amb cues curtes d'adenines en l'extrem 3' i que passaran a traduir-se activament posteriorment, durant la progressió de la meiosi (maduració de l'oòcit)⁸⁸. En relació amb això s'ha vist que la proteïna CPEB1 no només fa la seva funció al citoplasma sinó que migraria al nucli on hi desenvolupa una altra funció: unir-se a pre-mRNAs que continguin seqüències CPE i "escurçar-los" els seus extrems 3'UTR, cosa que acabarà afectant la seva eficiència de traducció⁸⁹. Un cop al

citoplasma es recluten diferents factors que acaben conformant el complex de ribonucleoproteïnes per a la poliadenilació citoplasmàtica (RNP). Però la traducció roman aturada fins que algun estímul aconseguixi fosforilar la proteïna CPEB1 a través de la cinasa Aurora A (Figura 18). Aquesta nova conformació acabarà permetent la poliadenilació del missatger per efectes de la RNA polimerasa GLD2. La nova cua d'adenines, ara llarga, serà reconeguda per PABP (poly(A)-binding protein) que alhora permetrà unir eIF4G i promovent finalment l'inici de la traducció⁹⁰.

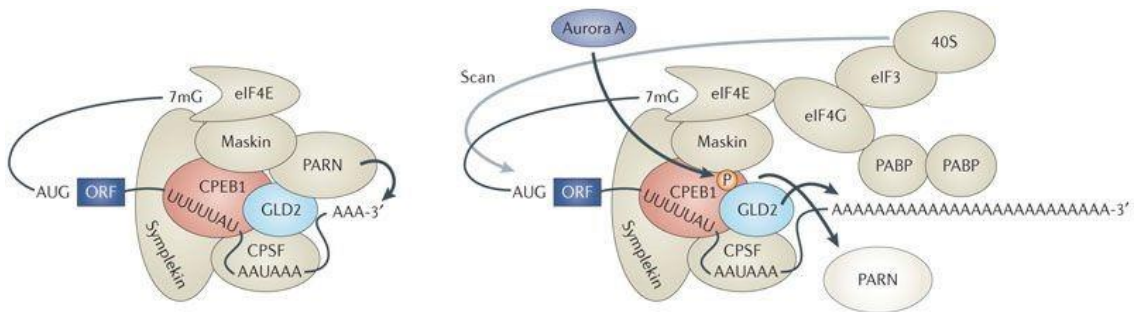


Figura 18: Model per a la regulació de la traducció de l'ARNm mitjançant la poliadenilació. Extreta de D'Ambrogio A, *Translational control of cell growth and malignancy by the CPEBs*, Nature Reviews Cancer (2013)

Les funcions biològiques de les CPEBs són moltes i variades i cada cop apareixen més estudis on es va dilucidant el seu paper també en patologies. Per exemple s'ha descrit el paper de CPEB4 i CPEB1 modulant processos de malignitat. En glioblastomes i tumors pancreàtics els nivells de CPEB4 es troben augmentats i en aquest últim cas hi ha un estudi que demostra que CPEB4 facilitaria l'expressió de l'activador tissular del plasminogen, tPA, que promouria proliferació tumoral, migració, invasió i vascularització⁹¹. Però també és

cert que en leucèmies i tumors del tracte digestiu els nivells de CPEB4 es troben regulats a la baixa, suggerint que les cèl·lules canceroses perden parcialment el control de la traducció. En el cas de CPEB1, hi ha estudis que suggereixen que actuaria com a supressor de tumors ja que quan hi ha una depleció d'aquesta proteïna en cèl·lules humanes i de ratolí aquestes són capaces d'escapar de la senescència⁹². En relació amb la senescència, hi ha estudis que demostren que les cèl·lules amb depleció de la proteïna CPEB1 experimenten l'efecte Warburg, un fenomen que es caracteritza per una reducció de la respiració mitocondrial que s'acompanya en contrapartida d'una glicòlisi augmentada per assegurar els nivells d'ATP⁹³. Es creu que l'efecte Warbourg és un mecanisme adaptatiu que adquireixen les cèl·lules tumorals per créixer en un ambient inhòspit.

Tornant als mecanismes reguladors de l'angiogènesi patològica, destaquem que el mRNA de VEGF conté seqüències CPEs al seu extrem 3' UTR, i que per tant és susceptible de poder ser regulat amb aquest altre mecanisme.

En relació a la hipertensió portal i cirrosi, s'ha vist que tant en mesenter i com en fetge hi ha un ràpid increment dels nivells i de l'activació per autofosforilació de la cinasa Aurora A, potser degut a l'estrès per lliscament, a l'increment del flux sanguini, a l'estrès mecànic, a citocines..... Aquesta cinasa, un cop activada, fosforila igualment la proteïna CPEB1, activant-la. Això promou, dins el nucli, el processat alternatiu en l'extrem 3' no traduït (UTR) dels ARN missatgers tant de CPEB4 com de VEGF i que elimina els elements repressors de la traducció dels transcrits (Figura 19) . En el cas de CPEB4, això suposa una sobreexpressió d'aquesta proteïna que a nivell citoplasmàtic s'encarrega de poliadenilar els ARN missatgers de VEGF, permetent així alts nivells de la proteïna VEGF⁸². Aquest model quedaria recolzat en l'estudi pel fet que en les primeres etapes de la hipertensió portal els nivells de ARNm de VEGF no canvien, no augmenten. No obstant els nivells de proteïna sí: hi ha una regulació traduccional, no transcripcional. Aquest model no exclouria possibles regulacions transcripcionals en moments més tardans de la hipertensió portal, ja que se sap que VEGF es regula també per aquest mecanisme, però aquest estudi seria el primer

en demostrar un nou mecanisme per a regular els nivells d'una proteïna essencial per als fenòmens d'angiogènesi patològica associats a hipertensió portal.

Important a destacar que si bé aquest mecanisme és essencial per al desenvolupament de l'angiogènesi patològica, no és indispensable per al manteniment de la vascularització fisiològica. De fet, els nivells d'aquestes proteïnes són baixes en homeòstasi i ràpidament es regulen a l'alça en contextos d'angiogènesi patològica; i de fet, quan s'utilitzen models de depleció gènica per aquestes proteïnes no es veu cap efecte en l'angiogènesi fisiològica associada a processos com la cicatrització, la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial o el desenvolupament embrionari⁸². I és aquest paper regulador tant específic, només en situacions patològiques, que fa atractiva aquesta família de proteïnes de cara a una possible estratègia terapèutica: podrien ser tractaments més segurs ja que reduirien específicament els nivells patològics de VEGF enlloc de fer-ho indiscriminadament baixant els fisiològics i els patològics. I això segur que podria reduir efectes adversos.

L'estudi demostra que suprimir les proteïnes CPEB en models experimentals animals d'hipertensió portal fa disminuir els vasos portocol·laterals, la neovascularització al mesenter i la circulació hiperdinàmica esplàncnica, principals causes de les complicacions més serioses de la hipertensió portal.

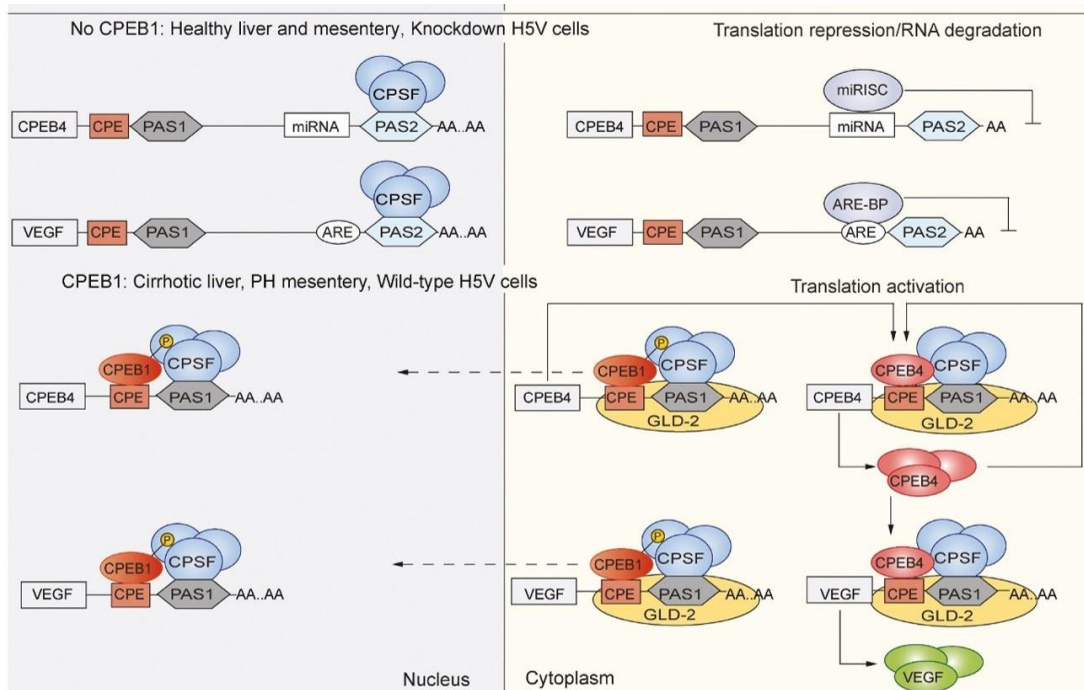


Figura 19: Model proposat: processat alternatiu dels ARNm de CPEB4 i VEGF en cirrosi i hipertensió portal (nucli) i poliadenilació citoplasmàtica d'aquests transcrits i conseqüent activació de la traducció de VEGF i CPEB4. Extreta de Calderone V, Gallego, J, et al. *Sequential functions of CPEB1 and CPEB4 regulate pathologic expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in chronic liver disease*, Gastroenterology (2016)

Justificació i Objectius

3. Justificació i objectius

La recerca en el camp de les malalties hepàtiques cròniques ha anat en augment les últimes dècades, en paral·lel amb els avenços generals en biologia molecular i cel·lular. Comprendre els mecanismes implicats en el desenvolupament de la hipertensió portal i cirrosi és essencial per seguir avançant i poder anticipar-se clínicament a les manifestacions de la malaltia. S'ha fet molta feina en relació a l'estudi dels mecanismes moleculars i cel·lulars que regulen l'increment de la resistència vascular intrahepàtica en cirrosi i s'ha posat de manifest el caràcter reversible dels components estructurals i vasoactius, al menys en les primeres fases de la malaltia. En el territori extrahepàtic, la hipertensió portal comporta un increment del flux sanguini esplàncnic i una formació de vasos portocol·laterals entre els que es troben les varius gastroesofàgiques.

Aquestes varius són fràgils i particularment propenses a trencar-se, originant sagnats gastrointestinals sovint torrencials i difícils d'aturar, i que posen en greu perill la vida del pacient. I per molts avenços que s'hagin fet en el camp, aquestes hemorràgies continuen sent causa d'una gran morbiditat i mortalitat. A més, aquesta derivació del flux sanguini des de la circulació portal a la sistèmica, saltant el pas hepàtic, fa que nombroses substàncies que solen ser normalment metabolitzades pel fetge (bactèries, toxines, hormones...) puguin escapar i arribar al sistema nerviós central. Les conseqüències d'aquest fet porten a altres greus complicacions: encefalopatia portosistèmica, peritonitis bacteriana espontània o sèpsia. És per això que la prevenció i la reducció de la formació dels vasos portocol·laterals s'erigeix com un dels principals objectius en el tractament de la hipertensió portal.

El desenvolupament dels vasos portocol·laterals és un procés complex i dinàmic que implica la reobertura de canals col·lapsats d'origen embrionari i la formació *de novo* de nous vasos, a través de fenòmens actius d'angiogènesi. A nivell esplàncnic, i més concretament al mesenter, també es dona una activa neovascularització que fa augmentar la densitat vascular en aquest territori i que de fet és crucial per a mantenir un flux

sanguini esplàncnic elevat, perpetuant i agravant així, la síndrome de la hipertensió portal. Conèixer bé com es formen aquests vasos, aprofundir en els mecanismes i molècules reguladores d'aquests processos i dissenyar una estratègia terapèutica innovadora i segura per disminuir aquesta vasculatura patològica són els **objectius** generals que justifiquen la present tesi doctoral.

D'aquesta recerca han sorgit dos estudis, dels quals en presento les seves hipòtesis i objectius particulars:

ESTUDI 1: *Identificació i caracterització de cèl·lules progenitores vasculars i el seu possible paper en la neovascularització associada a la hipertensió portal.*

La neovascularització patològica juga un paper essencial en molts aspectes de la hipertensió portal. Gran part de la recerca en el camp s'ha centrat en l'angiogènesi, la formació de nous vasos a partir dels preexistents. Això implica només la participació de cèl·lules endotelials adultes que s'activen i prolifereixen per formar el nou brot. Estudis recents han demostrat la participació directa de cèl·lules progenitores residents vasculars en diferents processos patològics, com per exemple en la restauració de l'endoteli després d'un dany, o bé en la formació de la placa d'ateroma. Però no s'ha demostrat encara, que a la hipertensió portal s'hi puguin donar fenòmens de vasculogènesi, que fins ara es pensava restringits a la vida embrionària.

Així doncs la **hipòtesi de treball** seria provar l'existència d'una població vasculogènica resident al territori esplàncnic que pugui contribuir de manera directa a la formació de nous vasos. Els objectius concrets d'aquest treball són:

1. Identificar i caracteritzar en profunditat aquesta població en el territori vascular esplàncnic, ja sigui en el teixit *in situ* o bé aïllada en cultiu cel·lular.

2. Estudiar si aquesta població s'activa i participa de manera directa en la neovascularització associada a la hipertensió portal.
3. Avaluar quin grau de contribució tindria aquesta població en la nova vasculatura en un context d'hipertensió portal i si aporta una rellevància biològica en aquesta patologia.
4. Esbrinar el paper de la proteïna reguladora de la traducció CPEB4 en les funcions biològiques de la població progenitora resident al vas, un cop conegut, prèviament, el seu paper regulador de l'angiogènesi patològica en aquesta síndrome.

ESTUDI 2: Inhibició específica per teràpia gènica de VEGFR2 en cèl·lules endotelials en ratolins amb hipertensió portal.

Per altra banda i des d'un punt de vista translacional, testar noves estratègies terapèutiques que bloquegin aquesta neovascularització patològica ha estat motiu d'estudi per molts grups de recerca en els últims temps. L'ús de fàrmacs com el sorafenib, un inhibidor multikinasa de vies proliferatives i proangiogèniques, o l'ús d'inhibidors endògens de l'angiogènesi com Vasohibin-1 o el factor derivat de l'epiteli pigmentari (PEDF) són exemples de treballs recents encarats a oferir alternatives terapèutiques per a les complicacions de la hipertensió portal^{38,94,95}.

Partint de la base que un possible tractament antiangiogènic ha de ser efectiu i també segur pel pacient, el segon treball proposa l'ús de teràpia gènica dirigida específicament contra l'endoteli vascular en un context d'hipertensió portal. Així, la **hipòtesi de treball** consistiria en dilucidar si aquest tipus de teràpia, basada en una tecnologia innovadora que utilitza ARN interferents amb la finalitat de reduir l'expressió proteica del receptor 2 de VEGF o KDR (Kinase Domain Receptor), és capaç de prevenir el desenvolupament de la

neovascularització patològica associada a la hipertensió portal. Els objectius concrets d'aquest treball són:

1. Validar l'eficàcia de les seqüències d'ARN interferent dissenyades per reduir l'expressió proteica dels nivells de VEGFR2 "in vitro" tant en cèl·lules murines com humanes.
2. Testar la captació específica dels liposomes o complexos lipídics que contenen els ARN interferents per part de l'endoteli de ratolins amb hipertensió portal.
3. Comprovar la capacitat de silenciar l'expressió endotelial de VEGFR2 mitjançant injecció intravenosa dels lipoplexes amb l'ARN interferent en ratolins amb hipertensió portal
4. Analitzar els efectes i el potencial terapèutic del tractament amb ARN interferent per a VEGFR2 sobre la neoangiogènesi i la hipertensió portal.

Còpies dels articles originals

4. Còpies dels articles originals

4.1 Estudi 1

Role and therapeutic potential of vascular stem/progenitor cells in pathological neovascularisation during chronic portal hypertension

Garcia-Pras E, Gallego J, Coch L, Mejias M, Fernandez-Miranda G, Pardal R, Bosch J, Mendez R, Fernandez M.

Gut 2017; 66:1306–1320. doi:10.1136/gutjnl-2015-311157

Role and therapeutic potential of vascular stem/progenitor cells in pathological neovascularisation during chronic portal hypertension

Ester Garcia-Pras,¹ Javier Gallego,¹ Laura Coch,¹ Marc Mejias,¹ Gonzalo Fernandez-Miranda,³ Ricardo Pardal,² Jaime Bosch,¹ Raul Mendez,^{3,4} Mercedes Fernandez¹

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311157>).

¹IDIBAPS Biomedical Research Institute, CIBERehd, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

³Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain

⁴Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

Correspondence to

Dr Mercedes Fernandez, IDIBAPS Biomedical Research Institute, CIBERehd, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona 08036, Spain; mercefernandez@ub.edu

Received 24 November 2015

Revised 9 February 2016

Accepted 24 February 2016

Published Online First

16 March 2016



► <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313547>



CrossMark

To cite: Garcia-Pras E, Gallego J, Coch L, et al. Gut 2017;**66**:1306–1320.

ABSTRACT

Objective Pathological neovascularisation is intimately involved in portal hypertension (PH). Here, we determined the contribution of vascular stem/progenitor cells (VSPCs) to neovessel growth in PH and whether the RNA-binding protein cytoplasmic polyadenylation element binding protein-4 (CPEB4) was behind the mechanism controlling VSPC function.

Design To identify and monitor VSPCs in PH rats (portal vein-ligated), we used a combinatorial approach, including sphere-forming assay, assessment of self-renewal, 5-bromo-2'-deoxyuridine label retention technique, in vitro and in vivo stem/progenitor cell (SPC) differentiation and vasculogenic capability, cell sorting, as well as immunohistochemistry, immunofluorescence and confocal microscopy expression analysis. We also determined the role of CPEB4 on VSPC proliferation using genetically engineered mouse models.

Results We demonstrated the existence in the mesenteric vascular bed of VSPCs displaying capability to form cellular spheres in suspension culture, self-renewal ability, expression of molecules commonly found in SPCs, slow-cycling features, in addition to other cardinal properties exhibited by SPCs, like capacity to differentiate into endothelial cells and pericytes with remarkable vasculogenic activity. Such VSPCs showed, after PH induction, an early switch in proliferation, and differentiated in vivo into endothelial cells and pericytes, contributing, structurally and functionally, to abnormal neovessel formation. Quantification of VSPC-dependent neovessel formation in PH further illustrated the key role played by VSPCs. We also demonstrated that CPEB4 regulates the proliferation of the activated VSPC progeny upon PH induction.

Conclusions These findings demonstrate that VSPC-derived neovessel growth (ie, vasculogenesis) and angiogenesis cooperatively stimulate mesenteric neovascularisation in PH and identify VSPC and CPEB4 as potential therapeutic targets.

INTRODUCTION

Portal hypertension (PH) is the most important complication of chronic liver disease and a leading cause of mortality worldwide.¹ PH is characterised by increased portal pressure, and concomitant increases in splanchnic blood flow and portosystemic collateral vessel formation.^{1 2} Recent studies

Significance of this study

What is already known on this subject?

- Angiogenesis is the formation of neovessels from activation and proliferation of mature endothelial cells in existing vasculature.
- Vasculogenesis is the de novo formation of vessels out of vascular stem/progenitor cells (VSPCs).
- Neovascularisation is a major pathological hallmark of chronic portal hypertension (PH).
- Cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB) proteins modulate pathological angiogenesis during PH by regulating the abnormal increase in vascular endothelial growth factor levels.

What are the new findings?

- Adult healthy mesenteric vessels harbour a population of vascular wall-resident stem/progenitor cells with vasculogenic potential.
- In response to PH induction, these cells proliferate, differentiate into vasculogenic cell types and structurally functionally contribute to abnormal neovessel formation.
- The relative contribution of VSPCs to pathological mesenteric neovascularisation in PH is high indicating that angiogenesis and vasculogenesis cooperatively stimulate neovascularisation in this setting.
- Mechanistically, we also show that the RNA-binding protein CPEB4 is an important factor responsible for the proliferative activity of stem/progenitor cell progeny.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Neovascularisation mediated by vascular wall-resident stem/progenitor cells could be a relevant pathological process for therapeutic targeting in PH.
- Our results also identify CPEB4 as a potential target for antivascular therapy, thus offering new and improved options for PH treatment.
- Because pathological neovascularisation also plays an essential role in many other diseases, including inflammatory diseases, diabetic retinopathy and cancer, our findings could be potentially beneficial also for a wide spectrum of vascular-related disease pathogenesis.

have demonstrated that pathological neovascularisation plays an essential role in multiple aspects of PH, as inhibition of neovessel formation attenuates portal pressure elevation, splanchnic hyperaemia, portosystemic collateralisation and liver fibrogenesis.^{3–12} Accordingly, antiangiogenic therapy has been proposed as a promising therapeutic approach for PH treatment.^{2 3 13}

Most research in the neovascularisation field has focused on angiogenesis, the formation of neovessels from activation and proliferation of mature endothelial cells (ECs) in existing vasculature.¹⁴ However, it is now evident that alternative vascularisation mechanisms may occur postnatally, including vasculogenesis, the de novo formation of vessels out of vascular stem/progenitor cells (VSPCs), which historically was thought to occur exclusively during embryological development.¹⁴ Indeed, recent studies have identified VSPCs residing dormant in the vascular wall of postnatal vessels under normal conditions, but possessing sphere-forming ability and proliferative potential, producing large numbers of daughter cells (ie, proliferative progenitors or transit-amplifying cells) that differentiate towards either ECs or smooth muscle cells (SMCs) when activated by injury stimuli.^{15–19} Even though these properties suggest that these cells may have a role in neovessel formation, the direct contribution and biological relevance of VSPCs to adult pathological neovascularisation in *in vivo* animal models, within the context of a disease, remain uncertain. Therefore, here we addressed these questions in the pathological setting of PH. These studies could extend our understanding of the mechanisms regulating pathological neovascularisation and lay the foundation for improved targeting therapy, which is of particular significance in the context of PH due to the limited availability of therapeutic options. In this study, we also aimed to elucidate whether the RNA-binding protein CPEB4 (cytoplasmic polyadenylation element binding protein-4) regulates the proliferative state of VSPCs. CPEB4 promotes polyadenylation and translation of target mRNAs harbouring a specific sequence, the cytoplasmic polyadenylation element (CPE), in their 3'-untranslated regions (3'UTRs)^{20–27} and has been implicated in regulation of SPCs in several tissues.^{28–30} Interestingly, we have recently documented that CPEB4-mediated translation is an essential regulatory mechanism for neovascularisation in various types of cancer,³¹ and also for pathological, but not physiological, vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression and neovessel growth in PH and cirrhosis.³²

METHODS

Additional methods described in online supplementary information include: Animal model, *in vitro* angiogenesis assay, coculture of mesenteric sphere-derived cells with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), isolation and sorting of mesenteric cKit+ cells, 5-bromo-2'-desoxyuridine (BrdU) immunodetection in cKit sorted cells, BrdU proliferation assay in spheres and attached cells, quantification of tissue vascularisation, histological analyses, immunohistochemistry, immunofluorescence, confocal laser microscopy and immunoblotting (see supplementary file).

Sphere formation assay

Briefly, rat and mouse superior mesenteric artery was cannulated and mesentery perfused with oxygenated Krebs solution (37°C, pH 7.4), until cells in the perfusate were completely absent (~30 min perfusion). Then, the mesentery was enzymatically digested (20 min, 37°C) in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.6 mg/mL collagenase-II, 0.1 mg/mL elastase, 0.26 mg/mL trypsin-I and 50 µM CaCl₂. Dispersed cells were cultured (5% CO₂, 37°C)

on six-well ultra-low binding plates in dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F12 with 20% fetal bovine serum (FBS), 1% N2-supplement, 2% B27-supplement, 1% penicillin/streptomycin/L-glutamine, 20 ng/mL recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF), 20 ng/mL recombinant human IGF-1, and 20 ng/mL recombinant human epidermal growth factor (EGF), to allow sphere formation.^{33–35}

In vivo long-term label-retaining chase assay

To identify putative VSPCs *in vivo*, we took advantage of the slow-cycling nature of SPCs and employed the long-term label-retaining chase methodology.^{36–40} Beginning within 5 days after birth, neonatal rats were injected subcutaneously with the DNA synthesis precursor, thymidine analogue, BrdU (Sigma), at a dose of 50 µg/g body weight in 0.9% NaCl saline, twice daily for three consecutive days (from day 5–7 after birth). During this neonatal period, there is a high rate of cellular proliferation compared with adulthood, since rodent tissues are still growing after birth and, therefore, BrdU is actively incorporated into the newly synthesised DNA of replicating cells (both rapidly dividing cells and slow-cycling cells) in place of thymidine.^{36–40} Animals were then sacrificed after a prolonged *in vivo* chase period (~90 days), during which the BrdU label was gradually diluted out from rapidly dividing cells. In contrast, slow-cycling cells underwent few divisions and retained a sufficiently high BrdU signal to be detected by immunohistochemistry, immunofluorescence and confocal microscopy.

Statistical analysis

Data are shown as mean ± SEM. Results that were normally distributed ($p > 0.05$ from Kolmogorov–Smirnov test) were compared with parametrical statistical procedures (Student's *t* test and analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test for multiple comparisons). Results that were non-normally distributed ($p < 0.05$ from Kolmogorov–Smirnov test) were compared with non-parametrical tests (Kruskal–Wallis one-way ANOVA and Mann–Whitney *U* test). $p < 0.05$ was statistically significant.

RESULTS

Adult mesentery harbours constitutively resident cells with stem capabilities

To investigate the relevance of VSPCs in pathological neovascularisation during PH, we focused our attention on the mesentery because excessive neovessel growth in this vascular bed is a pivotal feature of PH that contributes to disease aggravation.¹ We initially determined whether SPCs reside within the mesentery using *in vitro* sphere-forming assays, based on the ability of true SPCs to form spherical clusters of cells in suspension culture.^{33–35} The rat mesentery was extensively perfused with Krebs buffer (figure 1A) until blood cells in the perfusate were completely undetectable (figure 1B), to rule out contamination by progenitor cells potentially present on the circulation. Then, the mesentery was enzymatically digested, and dissociated cells were cultured on ultra-low binding plates, in a stem cell culture medium, at a low density of 3.33 cells/µL. Under these free-floating conditions, only mesenteric SPCs were able to grow, generating non-adherent spheres (figure 1C). In contrast, mature and fully differentiated mesenteric cells, including mature ECs and SMCs, which do not possess SPC capabilities, died under these *in vitro* conditions. After 4 days in suspension culture, 225 ± 20 primary spheres/well were counted ($n = 6$ independent assays), indicating that 2.25 ± 0.2% of the plated mesenteric cells had the capability of forming spheres. Of note, this

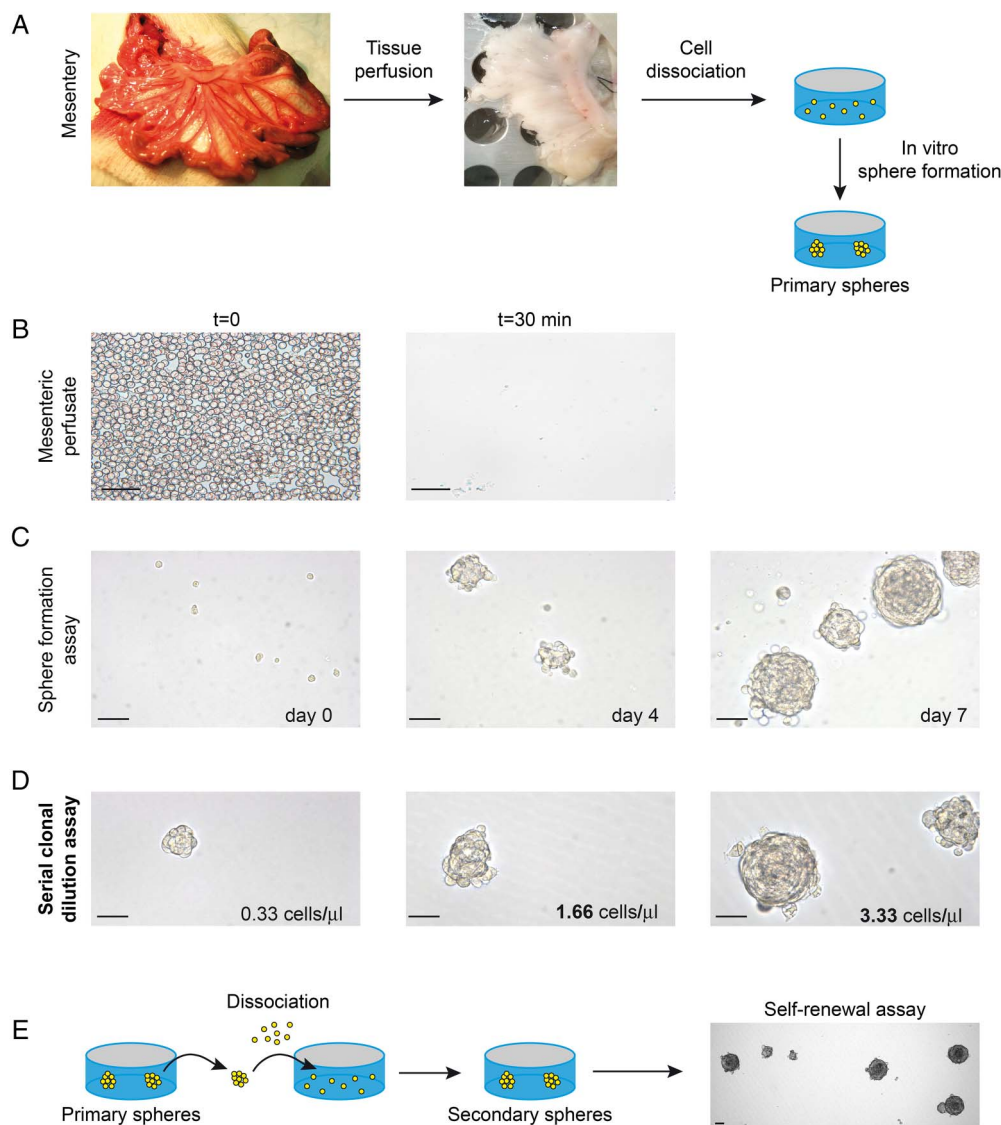


Figure 1 Identification of stem/progenitor-like cells in adult rat mesentery. (A) Mesentery tissue from adult control rats was dissected, cleaned of blood by extensive 30-min perfusion with Krebs buffer, minced and enzymatically digested, and cell suspensions obtained were tested for their ability to give rise to spheres under free-floating conditions. (B) Representative micrographs of smears of perfusate before and after starting perfusion, showing that blood cells were completely absent in the perfusate after the 30-min perfusion, indicating successful elimination of blood cells in the mesenteric tissue. Scale bars: 50 μ m. (C) Mesentery cells were isolated and grown in suspension culture, in stem cell medium, using ultra-low attachment six-well plates, at a low density of 3.33 cells/ μ L. Under these conditions, only mesenteric stem/progenitor cells (SPCs) generated spheres. Figure displays representative spheroids after 4 days and 7 days in suspension culture. Scale bar: 50 μ m. (D) Capability of mesenteric SPCs of growing under clonal conditions as spheres in vitro in suspension culture. After enzymatic digestion of mesenteric tissue from adult control rats, cellular suspensions were seeded on ultra-low binding six-well plates, at different plating densities (0.33 cells/ μ L, 1.66 cells/ μ L and 3.33 cells/ μ L), in stem cell culture medium. Under these serial clonal dilution conditions, mesenteric SPCs generated spheroids, which were clearly visible at 4 days after seeding. We calculated a ratio of one SPC per 44 mesenteric cells based on the number of spheres generated from the mesentery in six independent sphere-forming assays from six different rat mesenteries, providing a reliable estimation of the proportion of SPCs in the mesentery. Scale bar: 50 μ m. (E) Capability of mesenteric SPCs of growing as self-renewing spheres in vitro in suspension culture. Spheres were harvested after 4 days in suspension culture, dissociated with trypsin to form a suspension of single cells, and then plated again in floating culture at 1.66 cells/ μ L during 7 days. We found that the sphere-forming cells were able to propagate to form new spheres again, demonstrating their self-renewal capability in vitro. Scale bars: 50 μ m. pLys, poly-L-lysine.

proportion (1 SPC every 44 mesentery cells) is 2250 times higher than the expected number of progenitor cells in the bloodstream, which is known to be extremely low,⁴¹ falling to 1 in 100 000 blood cells. Therefore, the number of spheres greatly exceeds what would be expected by potential circulating progenitor cells remaining after perfusion. A serial clonal dilution assay is shown in figure 1D. We also found that cells derived from dissociated primary spheres were able to form new

secondary spheres again when replated in floating culture (figure 1E), demonstrating that spheres contain cells with self-renewal ability, which is another key property that defines an SPC.^{15 16} In a further step, we performed immunocytochemistry on mesentery-derived spheres transferred onto poly-L-lysine-coated coverslips and found that cells within these spheroids expressed several typical stem cell and endothelial progenitor cell markers,^{42–44} like cKit, CD133, Flk1 and CD34

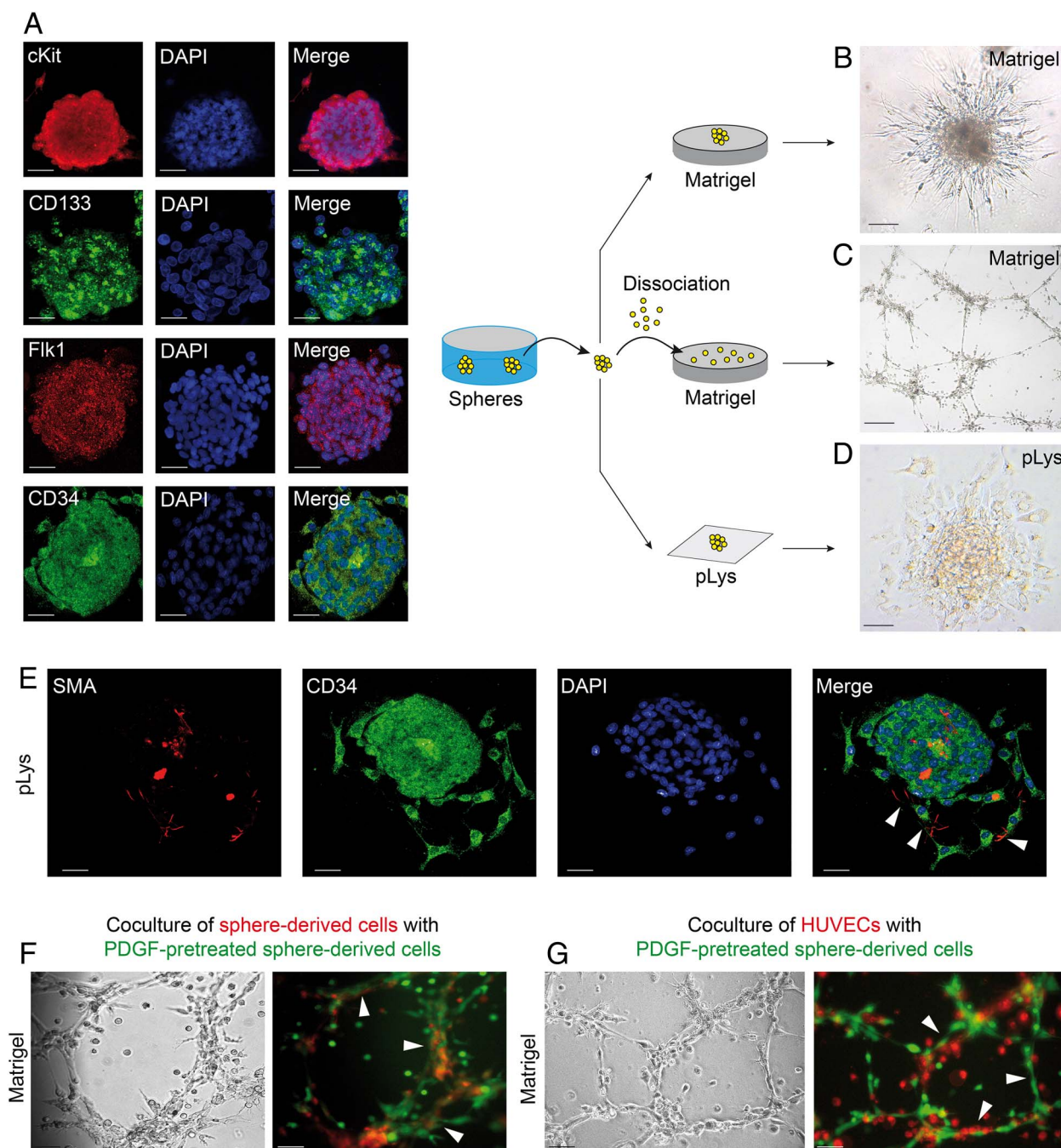


Figure 2 Characterisation of the vasculogenic potential of stem/progenitor-like cells from adult rat mesentery. (A) Confocal microscopy of mesentery-derived spheres, showing positivity for stem cell markers (cKit and CD133) and endothelial progenitor cell markers (Flk1 and CD34). Nuclei were visualised by 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (blue). Scale bars: 100 μ m. (B) Mesentery-derived spheres were placed on ECmatrix, supplemented with vascular endothelial growth factor (VEGF, 50 ng/mL). Within 21 h of seeding, multiple cord-like structures growing from individual spheroids were clearly visible. Scale bar: 50 μ m. (C) Mesentery-derived spheres were trypsinised and single cells were seeded on ECmatrix, with 50 ng/mL VEGF, at a density of 20 000 cells/well, on 96-well plates. After just 4–6 h, these cells formed an extensive tubular network through the whole gel, including thin, flat cells, with endothelial morphology. Scale bar: 50 μ m. (D) Cells adhered to poly-L-lysine (pLys) for 2 h. Scale bar: 100 μ m. (E) Confocal microscopy showing that spindle cells at the edge of the spheroids were SMA+ (red). Merge with CD34 (green) is also shown to better visualise the fibroblastic appearance of SMA+ cells. Nuclei were visualised by DAPI staining (blue). Scale bars: 100 μ m. (F) Confocal microscopy of coculture on Matrigel of dissociated cells from spheres labelled either with Dil (red) or calcein (green). Dil-labelled cells were first seeded on Matrigel for 3 h to allow for formation of tubular network, and then calcein-labelled cells, which had been preincubated with platelet-derived growth factor (PDGF) to stimulate the differentiation to pericytes, were added. Cells were cocultured during 3 h on Matrigel. Arrowheads point to the tight association of PDGF-preincubated sphere-derived cells (green) surrounding the endothelial tube-like structures (red). Scale bars: 25 μ m. (G) Confocal microscopy of coculture on Matrigel of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) labelled with Dil (red) and dissociated cells from spheres labelled with calcein (green). HUVECs were first seeded on Matrigel for 6 h to allow formation of tubular network, and then calcein-labelled cells, which had been preincubated with PDGF, were added. Cells were cocultured during 3 h on Matrigel. Arrowheads point to the tight assembling of PDGF-preincubated sphere-derived cells (green) to the endothelial tube-like structures (red) in a pericyte-like manner. Scale bars: 25 μ m. SMA, α -smooth muscle actin.

(figure 2A). Altogether, these results provide functional evidence for the existence of SPCs in adult mesenteric vasculature.

Mesenteric SPCs have vasculogenic properties in vitro

To test whether individual cells from mesentery-derived spheres had differentiative and vasculogenic capability in vitro, we first plated spheroids onto Matrigel (to induce EC differentiation) and found that multiple cord-like structures growing from individual spheroids were clearly visible within 21 h of seeding (figure 2B), demonstrating the prominent in-gel sprouting capacity of spheres. Furthermore, we harvested spheres formed in suspension culture, dissociated enzymatically into single cells and placed them on Matrigel. Such cells self-organised into tube-like structures, resembling a branching network of small blood vessels (figure 2C), indicating that mesenteric cells comprise SPC fractions capable of EC differentiation and vasculogenesis in vitro. Interestingly, these cells also had the potential of giving rise to SMCs when cultured in appropriate induction media. Thus, we found that shortly after attachment of spheroids to poly-L-lysine-coated coverslips, several cells at the sphere periphery acquired an elongated cell shape (figure 2D), and showed expression of the SMC marker α -smooth muscle actin (SMA) (figure 2E). In addition, fluorescently prelabelled sphere-derived dispersed cells (green), preincubated with platelet-derived growth factor (PDGF) (for induction of SMC differentiation), were able to align in endothelial tube-like structures with typical SMC location and morphology on the vascular external surface when cocultured with either prelabelled sphere-derived cells (red) (figure 2F) or prelabelled HUVECs (red) (figure 2G) seeded on Matrigel, further suggesting that mesenteric SPCs had the potential of differentiating, in a controlled manner, into ECs and SMCs, and generate vascular-like structures. Importantly, this bipotency was unmasked in the specific in vitro conditions, and translated into the same set of fates being adopted in vivo (described later in the text).

Mesenteric SPCs reside in vascular walls of adult mesenteric vessels

Having demonstrated that the mesentery acts as a depot for SPCs, and that these cells have differentiation capacities and vasculogenic potential in vitro, we next sought to identify their precise localisation in vivo. Towards this end, we used the long-term chase, BrdU label-retaining in vivo approach, which is based on the slow-cycling growth of SPCs, and has been successful in detecting putative SPCs in multiple tissues.^{35–39} As detailed in Methods, BrdU was repeatedly administered to newborn rats, from day 5 to day 7 after birth, during postnatal organogenesis, to mark all proliferating cells, both rapidly dividing and slow-dividing cells, followed by an extended 90-day chase period without BrdU, during which rats reached adulthood (figure 3A). During this chase period, rapidly proliferating cells divide the BrdU label between daughter cells, consequently diluting the label. In contrast, slow-cycling cells undergo few divisions and retain detectable quantities of label in adult rats. We found that BrdU+ cells were predominantly confined to the vessel wall, but almost absent in all other cellular constituents within the mesentery, as demonstrated by BrdU immunohistochemistry (figure 3B; see immunohistochemistry controls in supplementary figure S1) and quantification of the number of BrdU+ cells (figure 3C). Of note, most mesenteric SPCs should retain the BrdU label (consistent with the slow-cycling properties of adult SPCs),^{35–40} but not all BrdU+ cells should be necessarily SPCs, because some differentiated non-SPCs can also divide infrequently. Therefore, to demonstrate that BrdU+ cells

located in vascular walls had SPC properties other than BrdU label retention, we conducted several additional analyses. First, we carried out double-immunofluorescence for BrdU and for the proliferation marker Ki67,⁴⁵ and found that BrdU+ cells in healthy adult mesenteric tissue were mitotically quiescent, as indicated by the lack of Ki67 immunoreactivity (figure 3D). Second, we used the SPC marker cKit,⁴² and fluorescence-activated cell sorting for immunoselection of cKit+ and cKit– cells from the mesentery of adult rats that were treated with BrdU in the neonatal stages (figure 3E). BrdU immunofluorescence in sorted cells and subsequent quantitative analysis showed enrichment of the proportion of BrdU+ cells within the cKit+ population, but not within the cKit– fraction (figure 3E, F), suggesting that BrdU+ cells in vivo correspond mainly to SPCs. Third, we obtained mesenteric cells from BrdU-treated rats and resuspended them in SPC medium to form spheres. These spheres retained BrdU after 3 days in suspension culture, this labelling being markedly diluted out after more successive rounds of cell division in the 6-day spheres (figure 3G), reinforcing that the cells with SPC properties that we studied in vitro (figures 1 and 2) were largely derived from the long-term BrdU-retaining cells observed in vivo (figure 3B, C), even if some BrdU+ slow-cycling cells in vivo do not correspond to SPCs. This view was further supported by studies using rat portal vein, a large vessel into which venous blood from the mesenteric vascular bed ultimately flows. Portal veins were aseptically harvested, separated from surrounding tissues, cut longitudinally, washed to eliminate circulating cells and enzymatically digested. Dissociated cells were then cultured under free-floating conditions to test for their ability to form spheres. Indeed, cell suspensions, which derive exclusively from portal vein vascular wall, gave rise to spheres that expressed endothelial progenitor cell markers Flk1 and CD34 (figure 3H), demonstrating the presence of sphere-forming SPCs in portal vein vascular wall. In addition, using in vivo BrdU chase approach, we consistently found BrdU+ cells throughout all the vascular wall compartments of the portal vein (figure 3I), as indicated by BrdU immunohistochemistry. Together these results indicate that vascular walls of mesenteric microvessels and the portal vein of adult rats contain cells with functional and phenotypical characteristics of SPCs.

Mesenteric VSPCs give rise to proliferative progeny that differentiates into ECs and SMCs and contribute to neovascularisation in PH

To address whether mesenteric VSPCs contribute to PH-related neovascularisation, we administered BrdU to rats from 5 days to 7 days postnatally followed by 90 days of chase, like before, but then, subjected the already adult rats to partial portal vein ligation (PPVL) to induce PH, or to sham operation in controls. Animals were sacrificed and tissues collected at various times after initial surgeries (6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h; n=5 for each time point and experimental group) to spatiotemporally monitor how BrdU+ cells behaved during neovessel growth. Soon after PH induction, there was a rapid increase in BrdU+ cell number in mesenteric vessel wall, peaking at 72 h and declining thereafter, as visualised by immunohistochemistry (figure 4A), and by immunofluorescence (figure 4B, C). The decline in number of BrdU+ cells in the mesentery beyond 72 h was likely due to dilution of label in successive generations of daughter cells through continued cell proliferation. Indeed, the majority of BrdU+ cells were actively cycling (ie, were also Ki67+) (figure 4D), a coexpression that was absent in control rats (figure 3D), suggesting that PH

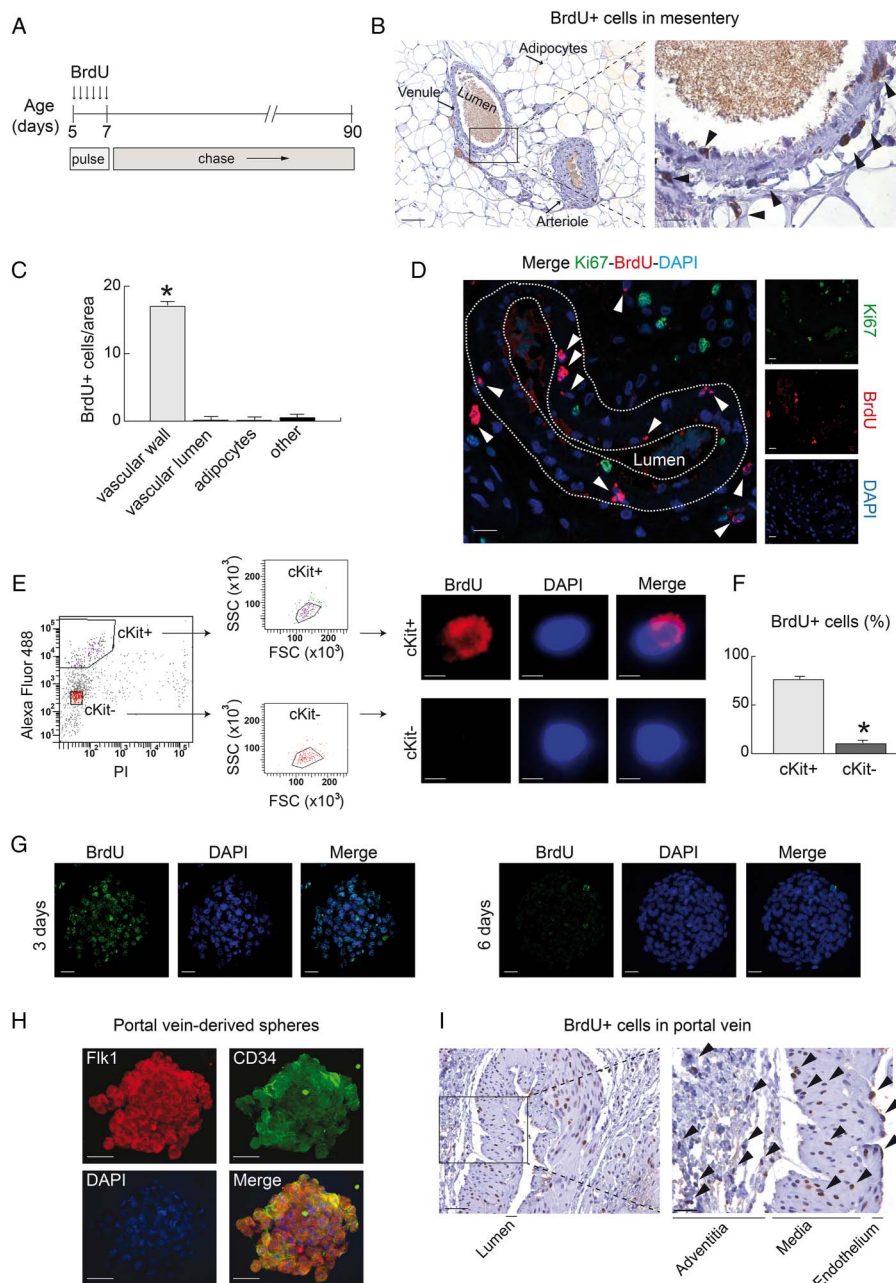


Figure 3 Identification and characterisation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-retaining cells in vivo. (A) Schematic representation of in vivo BrdU pulse-chase assays. BrdU was injected daily to neonatal rats for times indicated. BrdU labelling retaining cells were analysed by immunohistochemistry after a chase period of 90 days. (B) BrdU immunohistochemistry showing BrdU+ cells in mesenteric vascular bed, both venules and arterioles. Adipocytes, the largest component of loose connective tissue of the mesentery, did not stain for BrdU. Note that adipocytes appear empty as lipids are extracted during specimen preparation. Boxed area is magnified to see that BrdU+ cells were located in all vascular wall layers from mesenteric vessels: endothelium, media and adventitia. Scale bars: 100 μ m (left) and 50 μ m (right). (C) Quantification of BrdU+ cells in vascular wall and vascular lumen of mesenteric vessels, in mesenteric adipocytes and in other components of the mesentery including nerves. (D) Double-immunofluorescence showing that BrdU+ cells (red) did not express the cellular proliferation marker Ki67 (green) (arrowheads). Cell nuclei were visualised by 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). Split channels are at right. Dashed lines outline the vascular wall. Scale bars: 50 μ m. (E) Representative fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of mesentery-derived cells from adult rats, treated with BrdU in neonatal stages. Cells were sorted for expression of the stem cell marker cKit and on the basis of single cellularity and viability (propidium iodide, PI). Gating of cells on a forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) dot plot is also shown. BrdU immunofluorescence (red) on cKit+ and cKit- cell fractions is shown at the right. Nuclei were visualised by DAPI staining (blue). Scale bars: 25 μ m. (F) Quantification of BrdU+ cells in cKit+ and cKit- cell fractions obtained after FACS. Only cells that were brightly fluorescent for BrdU were counted. (G) Mesenteric cells were obtained from BrdU-treated rats and resuspended in stem cell medium to form spheres. After 3 days and 6 days, spheres were transferred onto poly-L-lysine-coated coverslips and immunostained with anti-BrdU antibody. Representative BrdU immunofluorescence (green) in spheres from BrdU-treated rats is shown. Nuclei were visualised by DAPI staining (blue). Scale bars: 100 μ m. (H) Rat portal veins were dissected, cleaned of blood, minced and enzymatically digested, and cell suspensions obtained were tested for their ability to give rise to spheres. Vascular stem/progenitor cells (VSPCs) isolated from portal vein gave rise to spheres under free-floating conditions. Immunocytochemical analysis of these portal vein-derived spheres, after 8 days in suspension culture, showed positivity for endothelial progenitor cell markers, Flk1 and CD34. Scale bar: 100 μ m. (I) Immunohistochemical detection of BrdU in rat portal vein showing a substantial amount of BrdU+ cells throughout all vascular wall compartments (arrowheads). These cells were especially abundant within the medial coat, although were also clearly seen in endothelium and adventitia. Scale bars: 100 μ m (left) and 50 μ m (right).

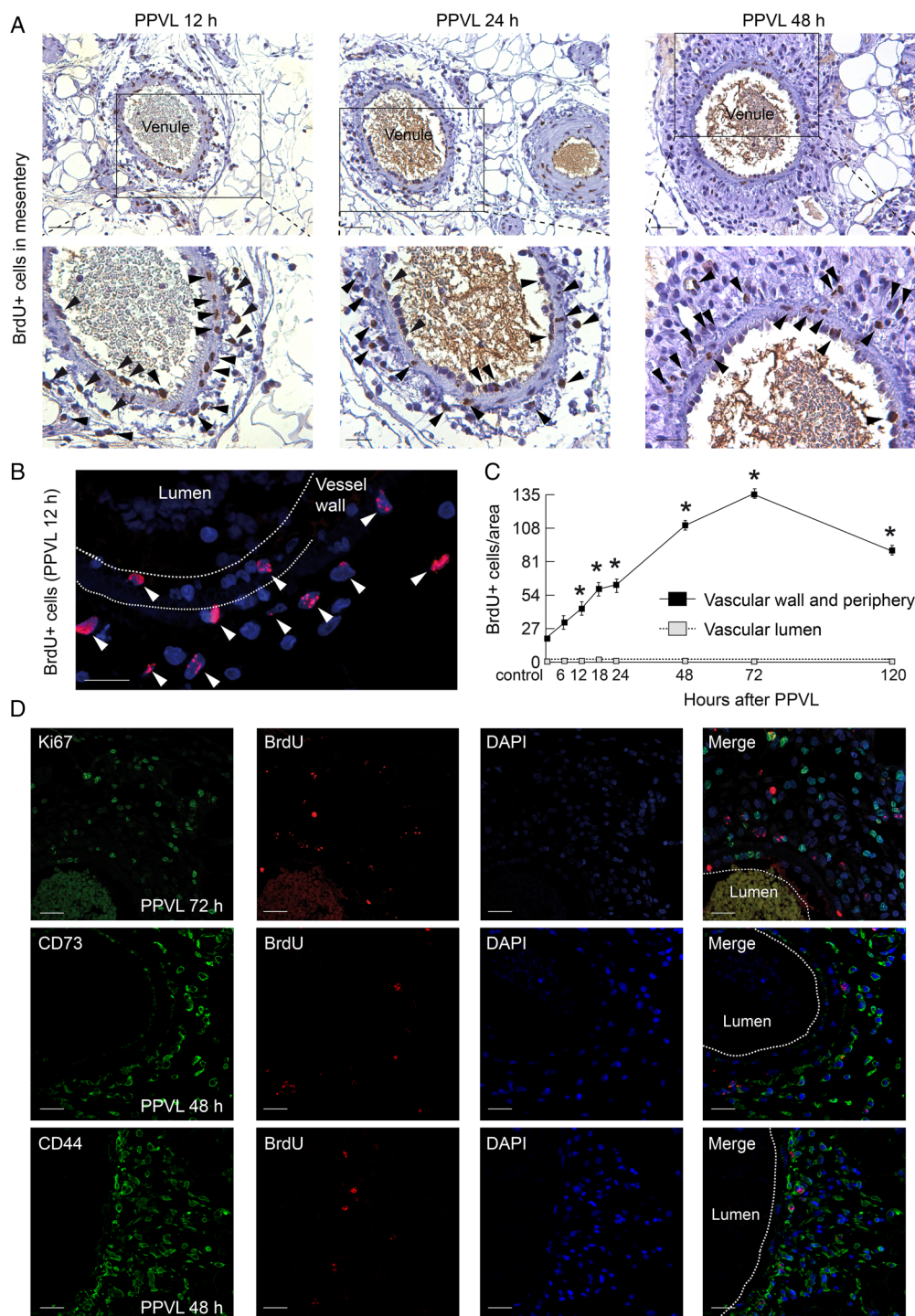


Figure 4 Proliferation of vascular stem/progenitor cell (VSPC) progeny during mesenteric neovascularisation in portal hypertension (PH). (A) 5-bromo-2'-desoxyuridine (BrdU) immunohistochemistry showing BrdU+ perivascular hypercellularity in mesenteric microvessels (arrowheads), which is evident already at 12 h after PH induction by partial portal vein ligation (PPVL) in all the vascular wall compartments (endothelium, media and adventitia), compared with control rats (figure 3B). Immunostainings were performed at 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h, 72 h and 120 h after inducing PH. Representative photographs at 12 h, 24 h and 48 h are shown. Scale bars: 50 μ m (top) and 25 μ m (bottom). (B) Confocal microscopy demonstrating the expansion of BrdU+ cells (arrowheads) in the vascular wall of mesenteric vessels after PH induction, compared with control rats shown in figure 3B. Nuclei were visualised by 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (blue). Dashed lines outline vascular wall. Scale bar: 25 μ m. (C) Quantification of BrdU+ cells per area in sections obtained from a total of six mesenteries for each time point. The decrease in the number of BrdU+ cells in vascular wall and periphery detected at 120 h was due to dilution of the BrdU label following cellular proliferation. Of note, BrdU+ cells were never detected in the lumina of mesenteric vessels upon PH induction (dashed line near zero), further identifying the vascular wall of pre-existing vasculature as the primary source of these vasculogenic cells involved in PH-associated pathological neovascularisation. (D) Double-immunofluorescence and confocal imaging showing colocalisation of BrdU (red) and the cell proliferation marker Ki67 (green, top) or the mesenchymal stem cell markers CD73 (green, medium) and CD44 (green, bottom) in mesenteric vessels. Nuclei were visualised by DAPI staining (blue). Dashed lines outline vascular wall. Scale bars: 50 μ m.

triggered the switching of BrdU+ cells to a proliferative phenotype, presumably reflecting cell activation and generation of proliferative progenitors or transit-amplifying cells. Of note, BrdU+ cells were not detected in vessel lumina upon PH induction (figure 4C), further identifying the vascular wall as the primary source of BrdU+ cell progeny. Further immunophenotypical characterisation of these spindle-shaped cells demonstrated that they were positive for the stem cell marker cKit (figure 5A), and also expressed several typical cell surface markers and regulators of endothelial progenitor cells, such as CD34, Flk1 and VEGF (figure 5A).^{15–18} Immunostaining and colocalisation studies in mesentery sections also revealed that many of the VSPC descendants exhibited characteristics of mesenchymal stem cells, including positivity for CD73 (figure 4D), CD44 (figure 4D) and desmin (figure 5A), negativity for SMA and CD43 (figure 5A), capacity to synthesise collagen (Masson's trichrome staining) (figure 5A), and expression of regulators of mesenchymal stem cell function, such as PDGF receptor- β (PDGFR β) and transforming growth factor- β (figure 5A).^{15–18} These results suggest that VSPCs may represent an heterogeneous cell population and a potentially relevant local source for both ECs and SMCs during PH-associated pathological neovascularisation. Notably, PH induction also resulted in temporal and local upregulation of VEGF, PDGF, VEGF receptor Flk1 and PDGFR β in the mesenteric vascular bed, as demonstrated by immunoblotting (figure 5B). It is, therefore, conceivable that the interplay of these key growth factors provided by both the stem cells themselves and their microenvironment could contribute to create a provasculogenic local milieu in the mesenteric vascular tree during PH.

Of note, the BrdU+ proliferating daughter cells were not randomly distributed within the anatomy of the mesentery following PH induction. Rather, they were retained close to the vessels from which they have apparently originated, accumulating near the periphery of precursor vessels (figure 5A), which is the main site for neovessel formation in the mesenteric vascular bed in response to PH, as illustrated by H&E stainings and morphometric analysis of mesenteric sections (figure 6A, B). The perivascular localisation of these cells and the fact that their expansion commenced very early after inducing PH (figure 4A–C), preceding the time of maximal neovessel formation (figure 6A, B), together with their EC and SMC differentiation potential fit with their participation in mesenteric neovascularisation during PH. In support of this possibility, proliferating BrdU+ stem cells were actually seen physically incorporated into the vascular wall of mesenteric neovessels in response to PH (figure 6C–BrdU-Ki67-cKit), suggesting that VSPCs were capable of forming blood vessels *de novo* in vivo. We validated these results in two different experimental models of PH, portal vein stenosis (PPVL) and bile duct ligation (BDL) (figure 6C–BrdU, figure 7A, B). Quantitative analysis demonstrated that, indeed, a substantial fraction (between 65% to 75%) of PH-induced neovessels showed positive BrdU staining in their walls (figure 7B), suggesting that the contribution of VSPCs to abnormal neovascularisation is a common event during PH. Notably, BrdU+ cells were easily recognised integrated within both the endothelium and the perivascular coat of neovessels, as ascertained by immunohistochemistry for BrdU, SMA and the EC marker von Willebrand factor (vWF) in consecutive histological mesenteric sections (figure 6C–BrdU-vWF-SMA), as well as by BrdU-Flk1 and BrdU-SMA coimmunofluorescence stainings (figure 7C), suggesting that SPCs were capable of differentiating into ECs and/or SMCs and participate structurally and functionally to neovessel formation in PH. Additional evidence

of the integrity and functionality of this neovasculture comes from the observation that mesenteric neovessels having BrdU+ cells on their vascular wall after PH induction exhibited deposition of structural components, like collagen, in their wall, as demonstrated by Masson's trichrome staining (figure 6C–Masson's trichrome), and were apparently connected to the blood perfusion of the tissue, as recognisable for the consistent presence of circulating erythrocytes into their lumina (figure 7C). Another notable feature was the presence of actively proliferating BrdU+ cells along the length of microvascular sproutings emerging from pre-existing mesenteric vessels in response to PH induction (figure 7D, E), as indicated by BrdU-Ki67 dual staining (figure 7E). These cells were preferentially located in the endothelium of the growing sprout, although some of them were also tightly assembled to new sprouts in an SMC-like manner (figure 7D, E), further supporting the ability of VSPCs to give rise to ECs and SMCs *in vivo* during PH-associated neovascularisation, similarly to what we found *in vitro*.

To determine whether VSPC activation and proliferation was a context-dependent phenomenon restricted to sites of ongoing pathological neovascularisation, like the mesenteric vascular bed, or was rather ubiquitous and shared by other vascular territories like the systemic vasculature, which are known to be unaffected by processes of new vessel formation during PH,^{1,2} we carried out tracking of BrdU+ cells in two representative systemic vessels, the abdominal aorta and the vena cava. We found that the wall of these vessels contained abundant BrdU+ cells in control rats (see supplementary figure S2), as assessed by immunohistochemistry. These BrdU+ cells were also Ki67–, as indicated by immunostaining in consecutive tissue sections (see supplementary figure S2). We also corroborated that active neovessel growth was not occurring in these systemic vessels in response to PH (see supplementary figure S2). Remarkably, activation of BrdU+ cells was not readily detectable in these vessels in which abnormal neovascularisation was virtually absent after PH induction (see supplementary figure S2), suggesting that the vasculogenic potential of adult VSPCs remained dormant within steady-state vessels, unfolding only in those specific environments in which formation of new vessels was taking place in response to PH.

CPEB4 is important for proper cell proliferation of the VSPC progeny

Recent research found that CPEB4 is critical for cell division,^{20–27} SPC function,^{28–30} and pathological angiogenesis in cancer and PH.^{31,32} Thus, we checked whether CPEB4 was involved in the mechanism governing VSPC proliferation. We found marked mesenteric CPEB4 overexpression after PH induction (figure 8A), predominantly in the perivascular hypercellularity of mesenteric vessels, colocalising with BrdU, as illustrated by immunohistochemistry in serial mesenteric sections (figure 8B) and by coimmunofluorescence (figure 8C). CPEB4 upregulation occurred very early after PH induction, concomitantly with BrdU+ cell progeny proliferation (figure 4A–C), further suggesting that CPEB4 and VSPC proliferation could be functionally linked. In support of this idea, we found a high expression level of CPEB4 when SPCs were stimulated to proliferate in sphere-forming assays, as indicated by immunocytochemistry (figure 8D).

To more precisely characterise the CPEB4 role in VSPC proliferation, we took a genetic approach using conditional, tamoxifen-inducible CPEB4 knockout (iKO) mice, generated in our laboratory.³² In a set of studies, we induced PH in CPEB4 iKO and wild type (WT) mice by PPVL and found that mesenteric neovascularisation was greatly prevented by CPEB4

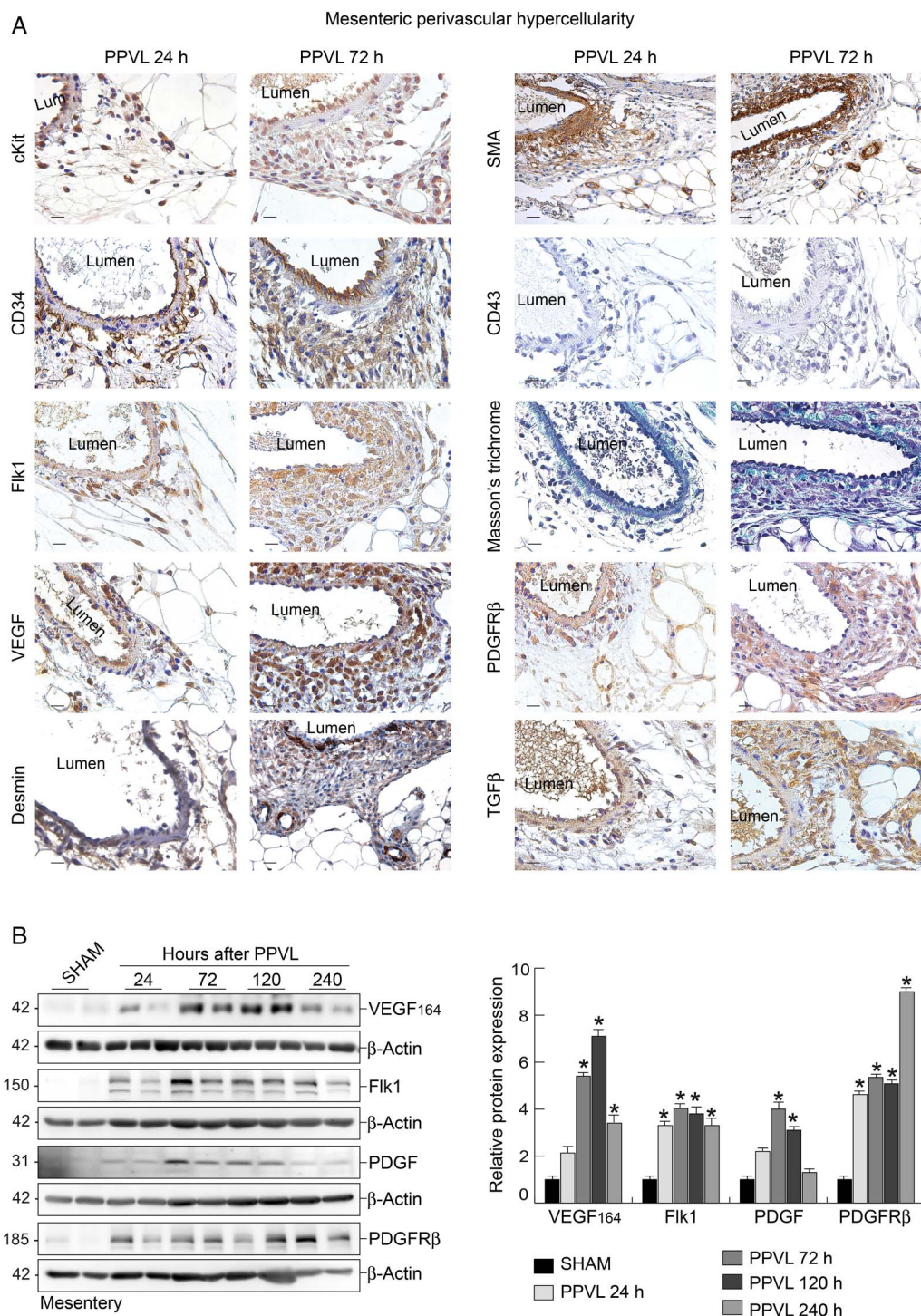


Figure 5 Immunophenotypical characterisation of the vascular stem/progenitor cell (VSPC) progeny in portal hypertension (PH). (A) Representative photomicrographs from immunohistochemical analyses in mesenteric sections from adult rats 24 h and 72 h after PH induction. The spindle-shaped cells that populated the perivascular area of mesenteric vessels with progression of PH were cKit+, CD34+, Flk1+, VEGF+, desmin+, PDGFRβ+, TGFβ+, SMA– and CD43– (they were also CD73+ and CD44+, as shown in figure 4D). Masson's trichrome staining also illustrated the capacity of these cells to secrete collagen. Scale bar: 20 μm. (B) Immunoblots of VEGF, Flk1, PDGF and PDGFRβ in rat mesentery at different times after inducing PH (left) and quantification of protein expression (right). β-Actin was used as a loading control. **p*<0.05 versus control rats. PDGF, platelet-derived growth factor; PDGFRβ, platelet-derived growth factor receptor-β; PPVL, partial portal vein ligation; VEGF, vascular endothelial growth factor; SMA, α-smooth muscle actin.

depletion (by 90%; *p*<0.001 vs WT), without effects on pre-existing normal vasculature density (figure 8E, F). In another set of studies, we performed sphere-forming assays in mesenteric cells isolated from CPEB4 iKO mice (see supplementary figure

S3), as described for rats (figure 1). Cells resuspended in SPC culture medium were treated with 1 μM tamoxifen to silence CPEB4, or with vehicle (ethanol) as control, from the time of seeding and during 7 days (figure 9A). Generated primary

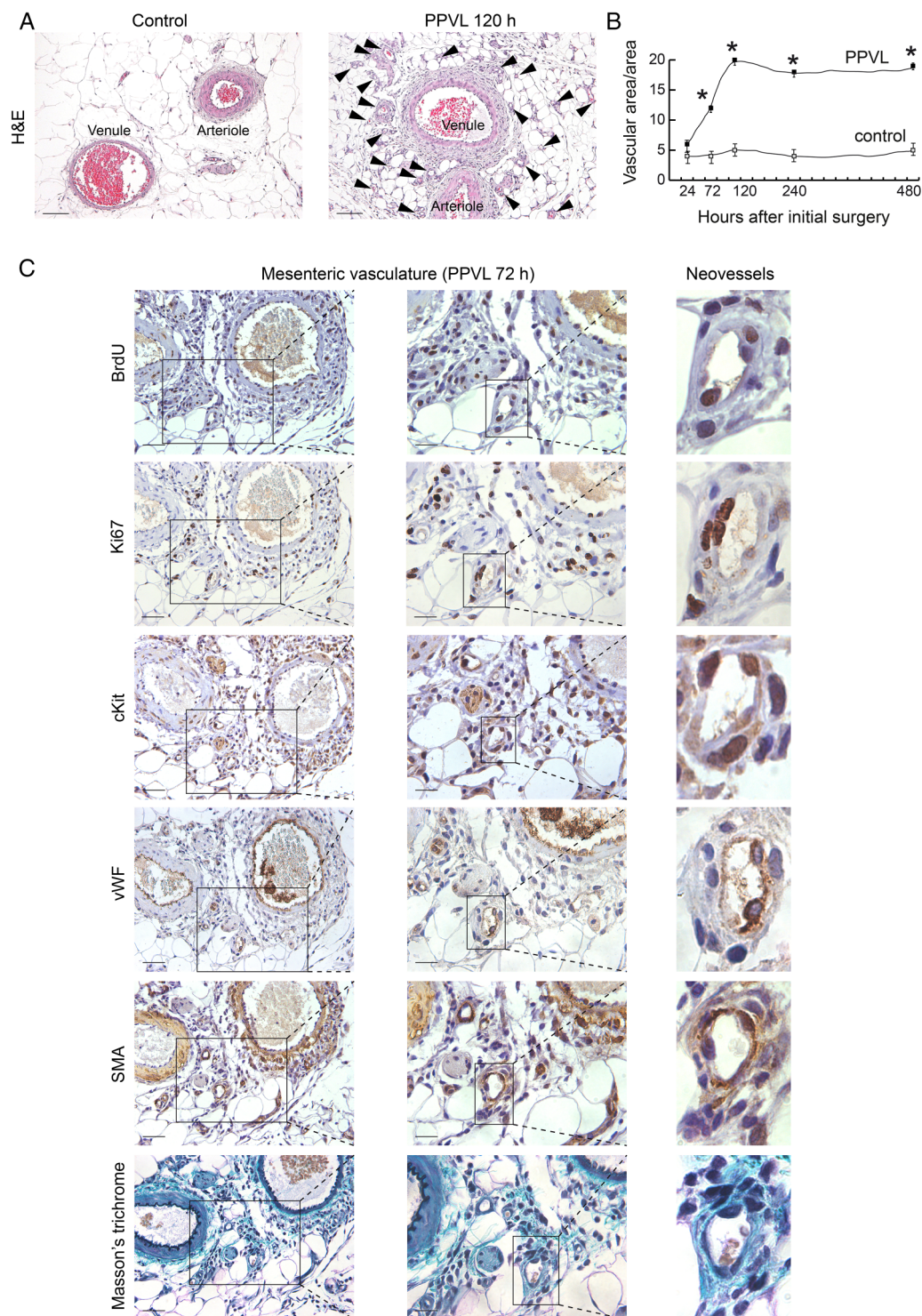


Figure 6 Characterisation of mesenteric vasculature and neovessels in portal hypertension (PH). (A) Photomicrographs of H&E-stained mesenteric sections showing substantial perivascular hypercellularity and increased vascularised area in the mesentery after PH induction, compared with the control group. Scale bar: 100 μm . (B) Quantification of the magnitude of PH-associated mesenteric neovascularisation (vascular area; in $\text{mm}^2/\mu\text{m}^2$) was performed, by morphometric analysis, over an observation period of 480 h after inducing PH. * $p < 0.05$ versus control rats. (C) Representative photomicrographs from immunohistochemical analyses in serial mesenteric sections from adult PH rats treated with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) in the neonatal period, showing expression of BrdU (long-term label-retaining cells), cKit (stem cell marker), Ki67 (cellular proliferation marker), vWF (EC marker) and SMA (SMC marker) in the perivascular hypercellularity and in the vascular wall of neovessels. Masson's trichrome staining shows that newly formed vessels were surrounded by collagen extracellular matrix. Note the presence of BrdU+ cells (top) incorporated into the vascular wall of neovessels, which developed in the periphery of mesenteric vasculature in response to PH induction. Scale bars: 50 μm (left), 25 μm (middle) and magnified detail of neovessel (right). EC, endothelial cell; PPVL, partial portal vein ligation; SMA, α -smooth muscle actin; SMC, smooth muscle cell; vWF, von Willebrand factor.

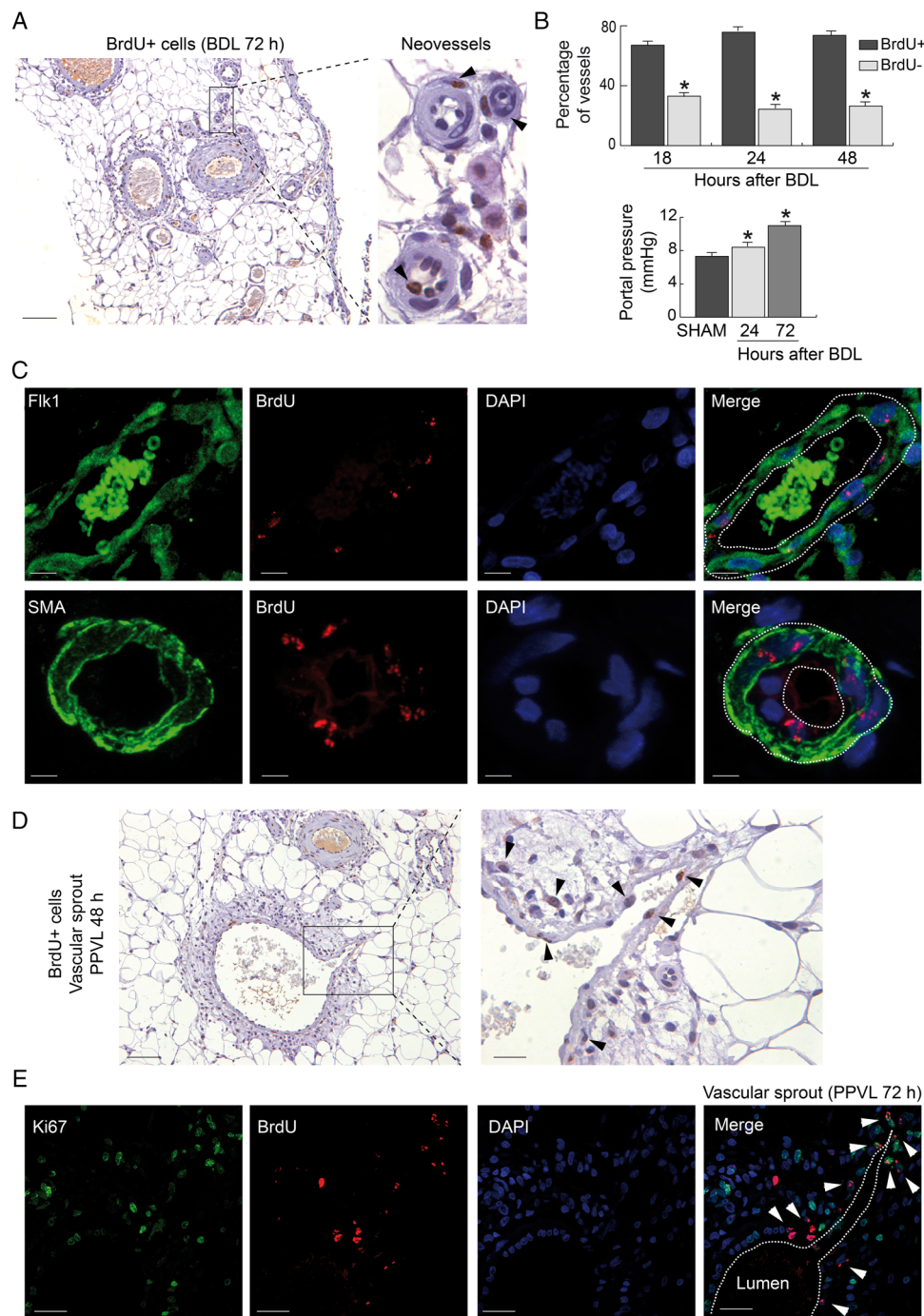


Figure 7 Contribution of vascular stem/progenitor cells (VSPCs) to mesenteric neovascularisation in portal hypertension (PH). (A) Immunohistochemical detection of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)+ neovessels in bile duct ligation (BDL) rat mesentery, indicating that the contribution of VSPCs to neovascularisation is not model-specific, but is also observed in different animal models of PH and cirrhosis. Low magnification at left and detail of neovessels with BrdU+ cells on their vascular walls at right. Scale bar: 100 μ m. (B) Top: Quantification of the number of mesenteric neovessels that had at least one BrdU+ cell integrated into their vascular wall after PH induction, related to the total number of vessels per mesenteric section (%). Measurements were limited to the first 48 h after cirrhosis induction, since results from later time points were difficult to interpret due to excessive dilution of the BrdU signal by repeated cell divisions. Data shown are from four animals in each experimental group. * $p < 0.01$ versus BrdU-negative vessels. Bottom: Note that portal pressure was already significantly increased at these early time points after BDL. * $p < 0.01$ versus sham-operated control rats. (C) Top: Confocal microscopy showing cells double-expressing BrdU (red) and Flk1 (green) in the endothelium of neovessels generated in the mesenteric vascular bed in response to PH. Bottom: Confocal microscopy showing cells double-expressing BrdU (red) and SMA (green) on the perivascular coat of newly formed mesenteric vessels after inducing PH. Nuclei were visualised by 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (blue). Dashed lines outline vascular wall of neovessels. Scale bars: 25 μ m. (D) BrdU immunohistochemistry illustrating the presence of BrdU+ cells in vascular sprouts of mesenteric vessels. Scale bars: 100 μ m (left) and 50 μ m (right). (E) Confocal microscopy of Ki67 (green) and BrdU (red), further demonstrating the presence of BrdU+ cells that were actively proliferating (arrowheads) along the length of vascular sproutings (dashed line) emerging from pre-existing mesenteric vessels in response to PH induction. Nuclei were visualised by DAPI staining (blue). Scale bars: 50 μ m. PPVL, partial portal vein ligation; SMA, α -smooth muscle actin.

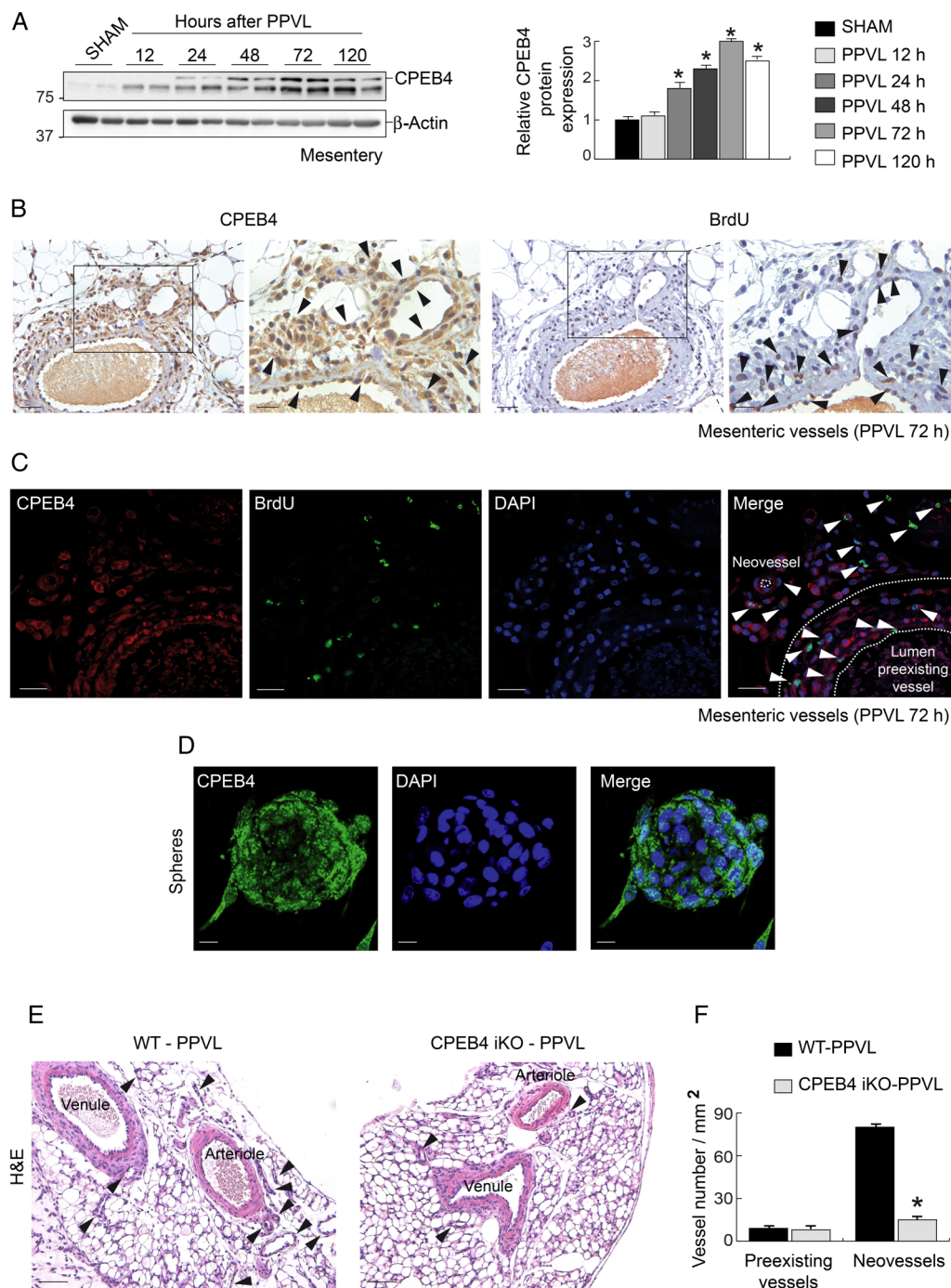


Figure 8 Cytoplasmic polyadenylation element binding protein-4 (CPEB4) expression in the mesentery in portal hypertension (PH) animal models. (A) Immunoblot of CPEB4 in rat mesentery at different times after inducing PH (left) and quantification of protein expression (right). β -Actin was used as a loading control. * $p < 0.05$ versus control rats. (B) Representative microphotographs of CPEB4 and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) immunohistochemistry in serial sections from rat mesentery after PH induction. Scale bars: 100 μ m (left) and 50 μ m (right). (C) Confocal microscopy of CPEB4 (green) and BrdU (red) demonstrating coimmunolocalisation of BrdU and CPEB4 protein in the hypercellularity present in the vascular periphery (arrowheads), as well as in the neovessels formed in response to PH induction. Nuclei were visualised by 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (blue). Dashed lines outline vascular wall of pre-existing vessel and neovessel. Scale bars: 50 μ m. (D) Immunocytochemistry demonstrating that CPEB4 (green) was highly expressed in spheres derived from mesenteric cells. Nuclei were visualised by DAPI staining (blue). Split channels are also shown. Scale bars: 50 μ m. (E) H&E staining of mesenteric sections from wild type (WT) and CPEB4 inducible knockout (iKO) mice subjected to partial portal vein ligation (PPVL) for 8 days to induce PH. Scale bars: 100 μ m. (F) Quantification of pre-existing vessels and neovessels in WT and CPEB4 iKO mice subjected to PPVL to induce PH. * $p < 0.05$ versus WT.

spheres were then harvested, genotyped, and their number and diameter quantified using computerised imaging analysis (AxioVision, Germany). A minimum diameter cut-off of 50 μ m was used in defining a sphere. Genotyping confirmed that

CPEB4 expression was turned off specifically in tamoxifen-treated spheres, but not in vehicle-treated spheres, from CPEB4 iKO mice (figure 9B). We found that mesenteric cells lacking CPEB4 (cultured with tamoxifen) formed fewer spheres in

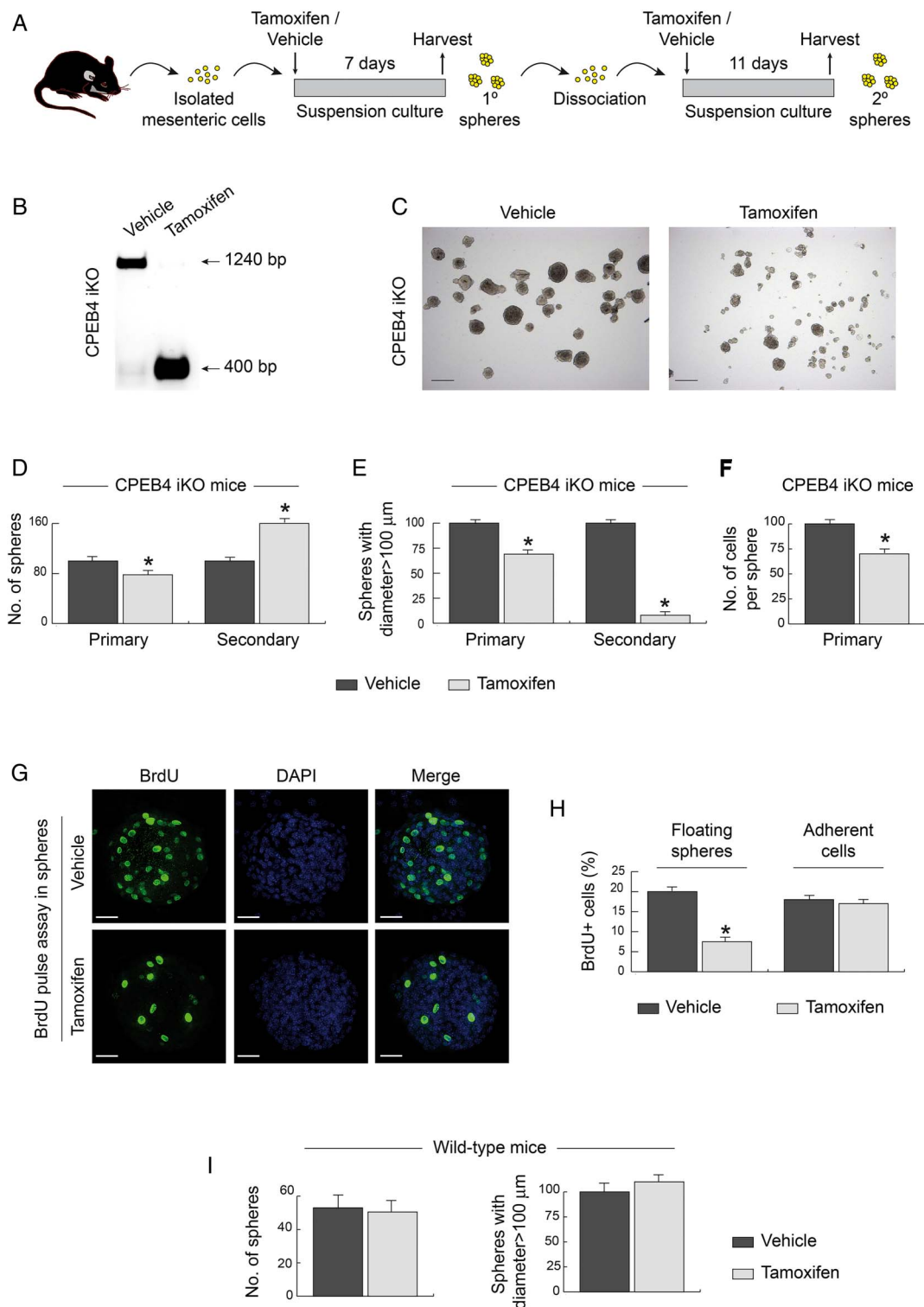


Figure 9 Cytoplasmic polyadenylation element binding protein-4 (CPEB4) is important for proper cell proliferation of the vascular stem/progenitor cell (VSPC) progeny. (A) Schematic illustration of the experiments. Mesenteric cells from CPEB4 inducible knockout (iKO) mice and wild type mice were isolated and cultured in suspension culture in the absence or presence of 1 μ M tamoxifen for 7 days. (B) Genotyping demonstrating effective depletion of CPEB4 in spheres from CPEB4 iKO mice after in vitro treatment with tamoxifen. (C) Sphere-forming assay of mesenteric-derived cells from CPEB4 iKO mice. Tamoxifen treatment, starting immediately after suspension culture, markedly decreased SPC capacity to form spheres. Scale bars: 100 μ m. (D) Quantification of the number of primary and secondary spheres from CPEB4 iKO mice after in vitro treatment with tamoxifen or vehicle. (E) Quantification of the diameter of primary and secondary spheres from CPEB4 iKO mice after in vitro treatment with tamoxifen or vehicle. (F) Single cells derived from dissociated spheres of CPEB4 iKO mice were counted with a haemocytometer. The number of cells per sphere was reduced in the absence of CPEB4 (ie, after tamoxifen treatment). Quantifications were from six different wells and were performed independently by two investigators. (G) 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) short pulse (no chase) in free-floating spheres from CPEB4 iKO mice. Representative immunofluorescence images showing BrdU immunostaining (green). Nuclei were visualised by 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (blue). Scale bars: 100 μ m. (H) Quantification of the data of BrdU incorporation. (I) Quantification of the number (left) and the diameter (right) of primary spheres from wild type C57BL/6 mice after in vitro treatment with 1 μ M tamoxifen or vehicle, demonstrating that tamoxifen per se (without CPEB4 depletion) had no effect on stem cell growth.

suspension culture than cells having CPEB4 (cultured with vehicle) (figure 9C, D), indicating that CPEB4 depletion affects the capacity of quiescent cells to generate spheres in vitro. When these primary spheres were mechanically dissociated to form a suspension of single cells, and then resuspended in SPC medium (figure 9A), cultures without CPEB4 contained more secondary spheres than cultures with CPEB4 (figure 9D). Because the number of secondary spheres corresponds to the number of sphere-producing cells within the primary sphere, these results indicate that the proportion of cells maintaining their SPC status per primary sphere was higher after CPEB4 depletion, most likely due to the fact that SPC descendants proliferated less readily in absence of CPEB4 and, therefore, diluted less their stem-like properties. Indeed, we observed that loss of CPEB4 impaired the proliferation of SPC daughter cells, as indicated by a lower average diameter of the spheres, both in the first (figure 9C, E) and second (figure 9E) generations, and a decreased number of cells per sphere (figure 9F).

To further determine if the absence of CPEB4 induces a defective cellular proliferative capacity in SPC progeny, free-floating spheres were treated with a short 4-h pulse of BrdU just prior to analysis. Spheres consistently showed a lower percentage of cycling cells (ie, lower percentage of BrdU+ cells) after CPEB4 depletion, compared with control spheres (figure 9G, H), suggesting that CPEB4 is important for proliferation of SPC progeny. The question was then whether the decrease in cell proliferation induced by CPEB4 depletion was reflective of a general effect in cell cycle or was rather confined to SPC descendants. To address this issue, BrdU pulse assay was also performed in cells dissociated from CPEB4 iKO mice-derived spheres that were subsequently attached to poly-L-lysine coated surface. We found that the absence of CPEB4 did not lead to a statistically significant difference in BrdU uptake under these in vitro adherent conditions (figure 9H), indicating that reduction in cell proliferation after CPEB4 depletion was induced selectively within activated, non-matrix attached, SPCs. Taken together, these data strongly suggest that CPEB4 has an important role in maintaining cell division of SPC progeny.

To confirm that the effects on VSPC proliferation described above were specifically due to CPEB4 depletion and not to an effect caused by the tamoxifen treatment per se, we isolated mesentery cells from WT C57BL/6 mice and cultured them for 7 days in suspension culture, in the presence of 1 μ M tamoxifen or vehicle (ethanol). Our results shown that tamoxifen treatment alone (without CPEB4 depletion) had no effect on VSPC cell growth (figure 9I).

DISCUSSION

The present study highlights the functional significance of VSPC-derived pathological neovascularisation as an important mechanism of formation of new blood vessels in adults, in the setting of PH, and identifies these SPCs as potential new therapeutic targets. This is relevant because abnormal neovessel formation represents a critical and clinically important hallmark feature of PH and chronic liver disease, for which few therapeutic options are available.¹ Thus, our findings provide direct in vitro and in vivo evidence demonstrating the existence of a distinctive population of SPCs located in the vascular wall of adult blood vessels. These VSPCs display some of the most widely accepted criteria for SPC recognition,^{15–17} including quiescence and slow-cycling properties, high proliferative potentiality, capability of growing as cellular spheres in suspension culture, expression of the specific biomarker cKit and other molecules commonly found in SPCs, and the ability to self-

renew and generate daughter cells. After appropriate in vitro induction, this VSPC progeny is able to differentiate into two vascular cells types (ECs and SMCs) with vasculogenic potential.

Following PH induction, mesenteric VSPCs become activated and produce daughter cells (ie, proliferative progenitors or transit-amplifying cells) that divide and differentiate into EC or SMC lineages, and readily incorporate into newly formed mesenteric blood vessels, contributing physically and functionally to neovascularisation in vivo during PH. The differentiation potential of VSPCs could be somehow dictated by a number of factors, including VEGF, PDGF and their receptors, which are increased within the precise tissue microenvironment of neovascularisation sites during PH, creating an appropriate milieu to facilitate VSPC differentiation towards either ECs or SMCs.

The vasculogenic role of VSPCs was demonstrated in widely accepted distinct animal models of PH (PPVL and BDL), strongly emphasising the importance of these cells as mediators of postnatal pathological neovascularisation in these settings. In addition, these in vivo studies enabled us to demonstrate the role of VSPCs in a context in which such cells were subjected to regulatory mechanisms that may be imposed in vivo by neighbouring cells, flowing blood, vascular pressure and so forth, thus accurately reflecting the biological responses of VSPCs that occur during pathological neovascularisation. Furthermore, quantification of the extent to which excessive neovessel formation was dependent upon VSPCs underscored that this process substantially relies on the specific contribution of these cells. Hence, PH-associated abnormal neovascularisation might conceivably be a heterogeneous process, arising through a combination of both neoangiogenesis and neovascularogenesis.

Our present findings also demonstrate that CPEB4 is an important regulator of cell proliferation in VSPC progeny. Thus, CPEB4 depletion in mesentery-derived SPCs markedly compromised their capacity to proliferate in suspension culture without inducing a global cell cycle arrest, in line with our previous data.²⁷ Our findings are also consistent with recent reports showing that CPEB4 is required for proper cell cycle progression in colony-forming unit erythroid progenitors.²⁹ Molecular mechanism underlying CPEB4-dependent VSPC propagation could be mediated by mitotic phase-specific cytoplasmic changes in poly(A) tail length of hundreds of mRNAs encoding factors that are differentially expressed during cell cycle.^{20–22} We also found that mesenteric CPEB4 expression increased considerably upon PH induction and correlated spatiotemporally with VSPC expansion and neovascularisation. Furthermore, CPEB4 deletion in knockout mice robustly prevented abnormal neovessel formation after PH induction, without hampering normal vasculature, in full agreement with our recent findings.³² Our present study, therefore, adds another facet to the 'proangiogenic' activity of CPEB4, namely, regulation of cell proliferation in VSPC descendants, which could coordinately act with the recently demonstrated VEGF-dependent function.³² Local activation of CPEB4 during PH could be triggered by haemodynamic forces, shear and mechanical stress, increased blood flow, cytokines and vascular growth factors, which may increase within the precise neovascularisation microenvironment.^{1,2} These factors may activate the serine/threonine Aurora kinase A, which in turn phosphorylates and activates CPEB1.^{32,46,47} Activation of CPEB1 promotes alternative nuclear processing within non-coding 3'UTRs of CPEB4 pre-mRNAs (due to the presence of CPE elements in the 3'UTR of CPEB4), leading to deletion of translation repressor elements from mature transcripts and subsequent translational activation and overexpression of CPEB4 protein. The

resulting CPEB4 then binds to CPE elements present on its own transcript, generating an autoamplification positive feedback loop that further enhances CPEB4 levels, as we have recently demonstrated.³² CPEB4, now present at high concentrations, may activate VEGF translation³² and stimulate the proliferation of the VSPC progeny, further contributing to mesenteric neovascularisation.

Our findings may also have direct translational implications. Thus, therapeutic targeting of both VSPC-derived neovascularisation (vasculogenesis) and new vessel growth mechanisms that use non-stem cell constituents (angiogenesis) may effectively block abnormal neovessel formation and improve antiangiogenic therapeutics. Furthermore, our present and recent studies,³² also identify CPEB4 as a potential target for antivascular therapy, thus offering new and improved options for PH treatment and potentially also other angiogenesis-dependent diseases, such as inflammatory disorders and cancer.

Acknowledgements The authors thank the IDIBAPS Biobank for sample and data procurement.

Contributors EG-P, JG: data acquisition, interpretation; LC, MM: data acquisition; RP, JB, RM: manuscript revision; RM, MF: study concept; MF: direction, manuscript writing, funding.

Funding This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO; SAF2011-29491 and SAF2014-55473-R to MF; BFU2011-30121, BFU2014-54122-P and Consolider RNAREG CSD2009-00080 to RM; PI13/00341 to JB), Fundación Botín by Banco Santander through its Santander Universities Global Division (to RM), Asociación Española contra el Cáncer (to MF and RM) and Worldwide Cancer Research (to MF and RM). GF-M is funded by a Juan de la Cierva contract from MINECO. The CIBERehd is an initiative from the Instituto de Salud Carlos III. IRB Barcelona is the recipient of a Severo Ochoa Award of Excellence from MINECO (Government of Spain).

Competing interests None declared.

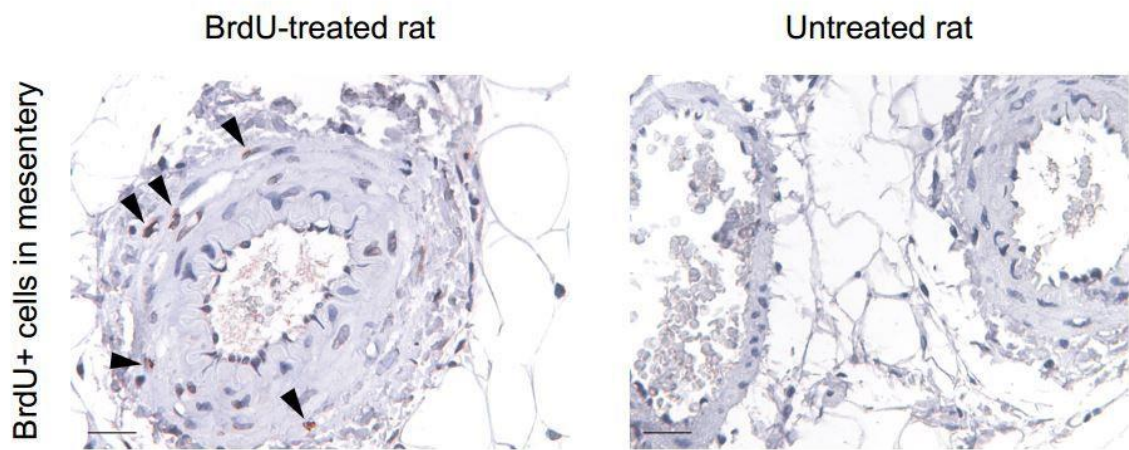
Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

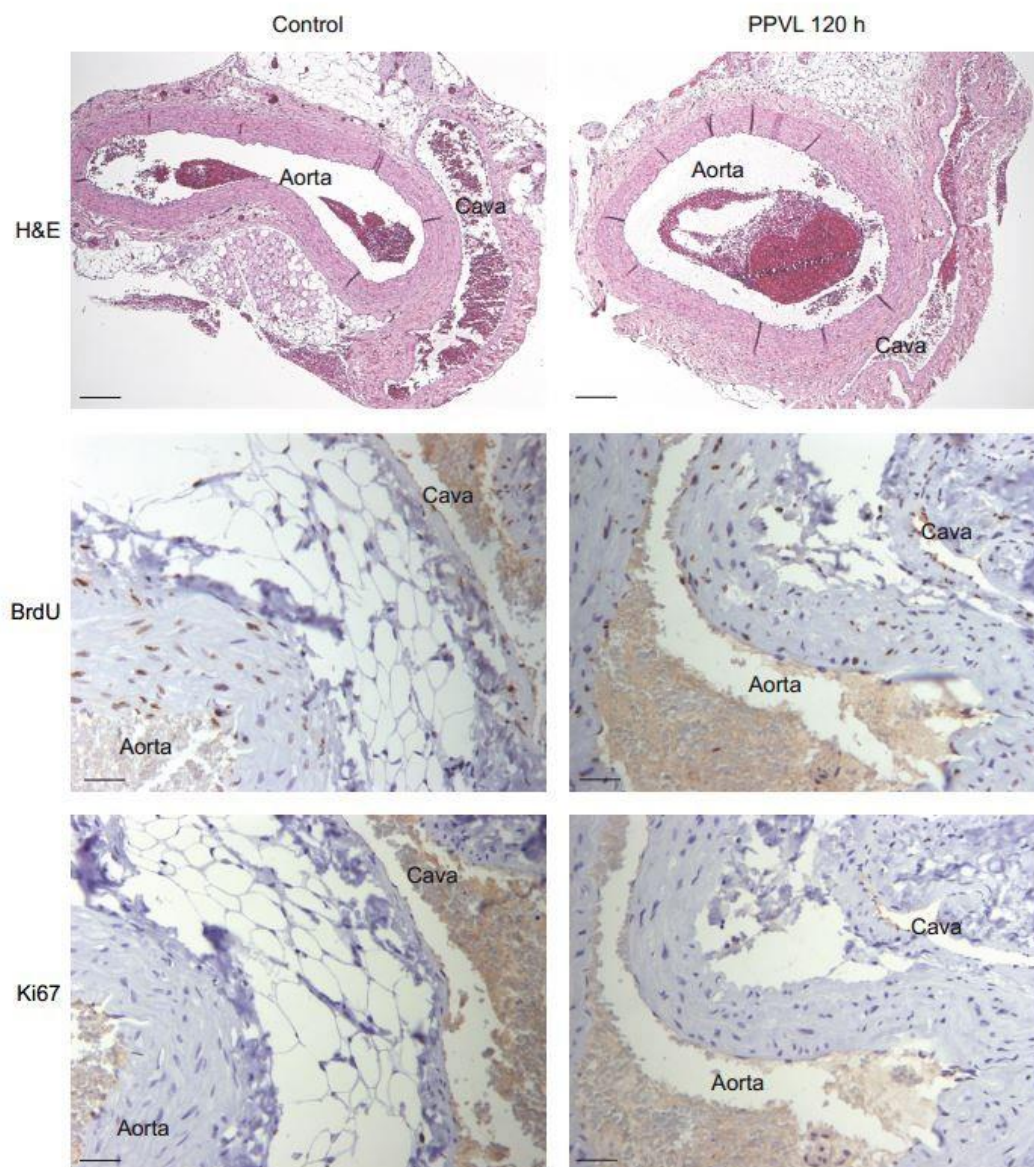
- Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, et al. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology* 2008;134:1715–28.
- Fernandez M. Molecular pathophysiology of portal hypertension. *Hepatology* 2015;61:1406–15.
- Fernández M, Semela D, Bruix J, et al. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50:604–20.
- Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, et al. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004;126:886–94.
- Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, et al. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 2009;49:1245–56.
- Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, et al. Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology* 2007;46:1208–17.
- Reiberger T, Angermayr B, Schwabl P, et al. Sorafenib attenuates the portal hypertensive syndrome in partial portal vein ligated rats. *J Hepatol* 2009;51:865–73.
- Tugues S, Fernandez-Varo G, Muñoz-Luque J, et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007;46:1919–26.
- Van Steenkiste C, Geerts A, Vanheule E, et al. Role of placental growth factor in mesenteric neoangiogenesis in a mouse model of portal hypertension. *Gastroenterology* 2009;137:2112–24.
- Van Steenkiste C, Ribera J, Geerts A, et al. Inhibition of placental growth factor activity reduces the severity of fibrosis, inflammation, and portal hypertension in cirrhotic mice. *Hepatology* 2011;53:1629–40.
- Coch L, Mejias M, Berzigotti A, et al. Disruption of negative feedback loop between vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor decreases portal pressure, angiogenesis and fibrosis in cirrhotic rats. *Hepatology* 2014;60:633–47.
- Mejias M, Coch L, Berzigotti A, et al. Antiangiogenic and antifibrogenic activity of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in bile duct-ligated portal hypertensive rats. *Gut* 2015;64:657–66.
- Shah VH, Bruix J. Antiangiogenic therapy: not just for cancer anymore? *Hepatology* 2009;49:1066–8.
- Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298–307.
- Bautch VL. Stem cells and the vasculature. *Nat Med* 2011;17:1437–43.
- Tilki D, Hohn HP, Ergün B, et al. Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. *Trends Mol Med* 2009;15:501–9.
- Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 2006;133:1543–51.
- Naito H, Kidoya H, Sakimoto S, et al. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J* 2012;31:842–55.
- Hu Y, Zhang Z, Torsney E, et al. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2004;113:1258–65.
- Fernández-Miranda G, Méndez R. The CPEB-family of proteins, translational control in senescence and cancer. *Ageing Res Rev* 2012;11:460–72.
- D'Ambrogio A, Nagaoka K, Richter JD. Translational control of cell growth and malignancy by the CPEBs. *Nat Rev Cancer* 2013;13:283–90.
- Weill L, Belloc E, Bava FA, et al. Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19:577–85.
- Bava FA, Eliscovich C, Ferreira PG, et al. CPEB1 coordinates alternative 3'-UTR formation with translational regulation. *Nature* 2013;495:121–5.
- Belloc E, Méndez R. A deadenylation negative feedback mechanism governs meiotic metaphase arrest. *Nature* 2008;452:1017–21.
- Piqué M, López JM, Foissac S, et al. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. *Cell* 2008;132:434–48.
- Igea A, Méndez R. Meiosis requires a translational positive loop where CPEB1 ensues its replacement by CPEB4. *EMBO J* 2010;29:2182–93.
- Novoa I, Gallego J, Ferreira PG, et al. Mitotic cell-cycle progression is regulated by CPEB1 and CPEB4-dependent translational control. *Nat Cell Biol* 2010;12:447–56.
- Choi KM, Barash I, Rhoads RE. Insulin and prolactin synergistically stimulate beta-casein messenger ribonucleic acid translation by cytoplasmic polyadenylation. *Mol Endocrinol* 2004;18:1670–86.
- Hu W, Yuan B, Lodish HF. Cpeb4-mediated translational regulatory circuitry controls terminal erythroid differentiation. *Dev Cell* 2014;30:660–72.
- Grudzien-Nogalska E, Reed BC, Rhoads RE. CPEB1 promotes differentiation and suppresses EMT in mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 2014;127:2326–38.
- Ortiz-Zapater E, Pineda D, Martínez-Bosch N, et al. Key contribution of CPEB4-mediated translational control to cancer progression. *Nat Med* 2012;18:83–90.
- Calderone V, Gallego J, Fernandez-Miranda G, et al. Sequential functions of CPEB1 and CPEB4 regulate pathologic expression of VEGF and angiogenesis in chronic liver disease. *Gastroenterology* Published Online First: 26 Nov 2015. doi:10.1053/j.gastro.2015.11.038
- Pardal R, Ortega-Sáenz P, Durán R, et al. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 2007;131:364–77.
- Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 2011;8:486–98.
- Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 2003;9:1293–9.
- Urbanek K, Cesselli D, Rota M, et al. Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9226–31.
- Kalabis J, Oyama K, Okawa T, et al. A subpopulation of mouse esophageal basal cells has properties of stem cells with the capacity for self-renewal and lineage specification. *J Clin Invest* 2008;118:3860–9.
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 2000;102:451–61.
- Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, et al. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 2004;114:795–804.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004;116:769–78.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241:58–62.
- Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990;63:213–24.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000;408:92–6.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75:2417–26.
- Gerlach C, Golding M, Larue L, et al. Ki-67 immunoreactivity is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab Invest* 1997;77:697–8.
- Mendez R, Hake LE, Andresson T, et al. Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* 2000;404:302–7.
- Mendez R, Murthy KG, Ryan K, et al. Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol Cell* 2000;6:1253–9.

SUPPLEMENTARY FIGURES

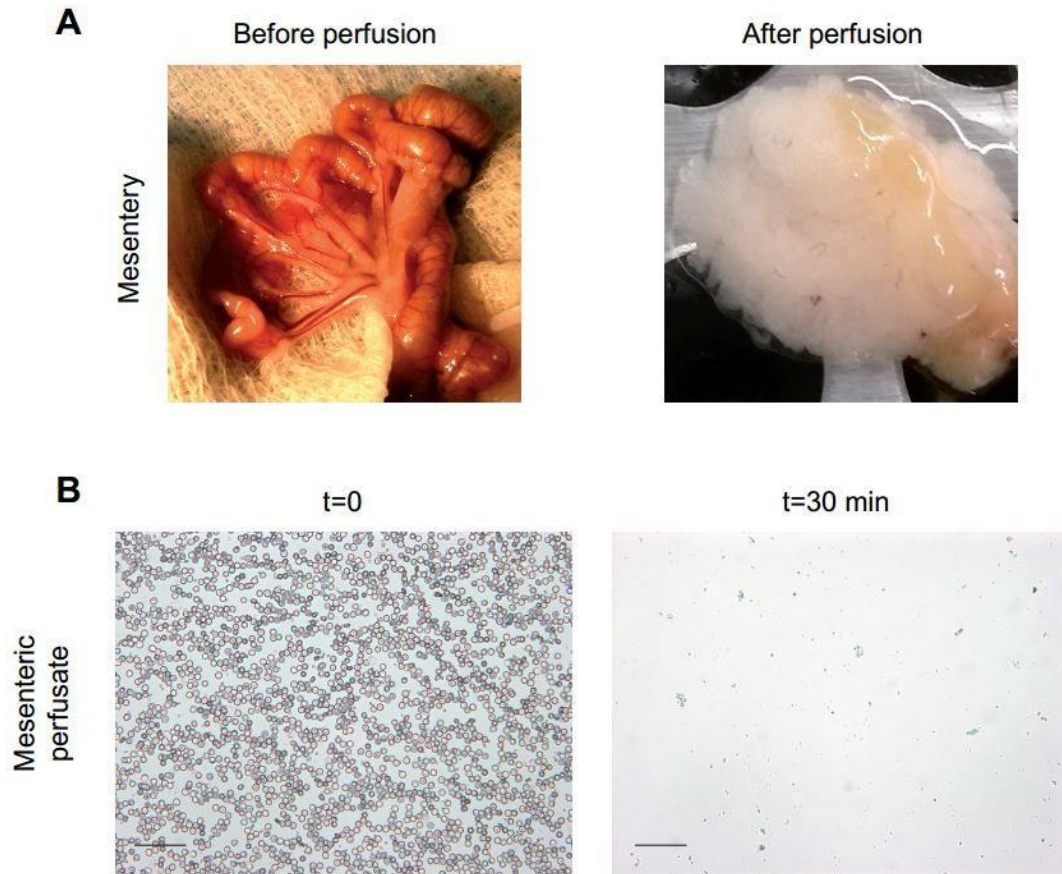
Supplementary Figure-1: Negative controls for BrdU immunohistochemistry Representative micrographs of BrdU immunohistochemistry in mesenteric sections from rats treated or not with BrdU in the neonatal period. BrdU immunostaining was only detected in the mesentery of BrdU-treated rats, but not in those that did not receive BrdU. Scale bars: 25 μ m.



Supplementary Figure-2: Activation of VSPCs is not ubiquitous, but is restricted to sites of ongoing neovascularization during PH (Top) Representative histological sections stained with H&E from the vena cava and the abdominal aorta of control rats (left) and PH rats (right) demonstrating that active neovessel growth was not occurring in these systemic vessels in response to PH. (Middle) Tracking of BrdU+ cells in the abdominal aorta and the vena cava demonstrating that the vascular wall of these representative adult systemic vessels contained abundant BrdU+ cells. Notably, activation of these BrdU-retaining cells was not readily detectable in response to PH induction. (Bottom) Ki67 immunohistochemistry in successive sections to those shown in "middle" microphotographs demonstrating the lack of significant cell proliferation in the abdominal aorta and vena cava after PH induction, compared with control rats.



Supplementary Figure-3: Isolation of mesenteric cells from mice (A) Mesentery tissue from adult CPEB4 inducible knockout mice or wild-type mice was dissected, cleaned of blood by extensive 30-min perfusion with Krebs buffer, minced and enzymatically digested, and cell suspensions obtained were tested for their ability to give rise to spheres under free-floating conditions. (B) Representative micrographs of frotis of perfusate before and after starting perfusion, showing that blood cells were completely absent in the perfusate after the 30-min perfusion, indicating successful elimination of blood cells in the mesenteric tissue. Scale bars: 50 μ m.



4.2 Estudi 2

Therapeutic siRNA targeting endothelial KDR decreases portosystemic collateralization in portal hypertension

Gallego J*, Garcia-Pras E*, Mejias M, Pell N, Schaeper U, Fernandez M.

* Coauthors

Scientific Reports, 2017 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14818-7>

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Therapeutic siRNA targeting endothelial KDR decreases portosystemic collateralization in portal hypertension

Javier Gallego^{1,2}, Ester Garcia-Pras^{1,2}, Marc Mejias^{1,2}, Nuria Pell^{1,2}, Ute Schaeper³ & Mercedes Fernandez^{1,2}

Development of portosystemic collateral vessels and gastroesophageal varices is responsible for the most serious clinical consequences of portal hypertension, but effective clinical therapies are limited. Here we developed and investigated the therapeutic potential of an innovative liposomally-formulated short-interfering RNA (siRNA) technology based on clinical stage components, capable to attenuate production of the endothelial kinase insert domain receptor (KDR), which controls portosystemic collateralization and contributes to disease progression and aggravation. These siRNAs were first validated *in vitro*, and then, their therapeutic potential on portosystemic collateralization and pathological angiogenesis was tested *in vivo* in mouse models of portal hypertension (portal vein-ligation). siRNA^{KDR}-lipoplexes efficiently transported siRNA^{KDR} to vascular endothelial cells in mesenteric microvenules and portal vein of portal hypertensive mice, where collateralogenesis and angiogenesis take place. This systemic treatment significantly downregulated pathological KDR overexpression, without causing complete KDR knockout, preserving homeostatic baseline KDR levels and thus limiting adverse effects. siRNA^{KDR}-lipoplex-induced endothelial-specific KDR knockdown drastically reduced by 73% the portosystemic collateralization, and impaired the pathologic angiogenic potential of vascular endothelial cells at different levels (cell proliferation, sprouting and remodeling). Targeting endothelial KDR with therapeutic siRNA^{KDR}-lipoplexes could be a promising and plausible treatment modality for attenuating the formation of portosystemic collaterals in a clinical setting.

Portal hypertension is one of the most significant complications of chronic liver diseases, which represent serious threats to human health^{1,2}. A major determinant of the severity of portal hypertension and liver disease is the development and maintenance of portosystemic collateral vessels, which include the gastroesophageal varices^{3–5}. These varices are fragile and particularly prone to leak blood and even rupture, causing upper gastrointestinal tract bleeding. This hemorrhage is often torrential and difficult to staunch, and, despite many advances made in this field, it continues to be the cause of significant morbidity and mortality in patients^{3–5}. Furthermore, because portosystemic collaterals shunt blood from the portal vein to the systemic circulation bypassing the liver, noxious substances that are normally metabolized by the liver, such as drugs, toxins, hormones and bacteria, can escape to the central venous system, leading to other potentially lethal consequences, such as portosystemic encephalopathy, spontaneous bacterial peritonitis or systemic infections. Therefore, one major objective in the treatment of portal hypertension and liver disease in humans is the prevention and reduction of portosystemic collateral growth^{3–5}.

Portosystemic collateralogenesis in portal hypertension and chronic liver disease is currently being recognized as a complex dynamic process that involves the reopening of collapsed embryonic channels, and the de novo formation of new collateral vessels through sprouting angiogenesis^{6–15}. Newly formed collaterals undergo additional structural and functional changes through vascular remodeling^{6–15}. Kinase insert domain receptor (KDR), also known as VEGF receptor-2^{16–20}, is an endothelial cell surface receptor that is abundantly expressed in portal

¹IDIBAPS Biomedical Research Institute, Hospital Clinic, University of Barcelona, 08036, Barcelona, Spain. ²CIBER of Hepatic and Digestive Diseases (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ³SilenceTherapeutics GmbH, Robert Rössle Str. 10, 13125, Berlin, Germany. Javier Gallego and Ester Garcia-Pras contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.F. (email: mercefernandez@ub.edu)

hypertension but not in normal tissues, and has a central role in the regulation of portosystemic collateral development^{6–10}, and pathological angiogenesis^{16–20}, as we and other groups have previously demonstrated. This means that KDR could be an excellent therapeutic target for portal hypertension and chronic liver disease^{21–23}. This is especially important because, although the pathophysiology and clinical consequences of portosystemic collateral growth have been studied in detail, this knowledge has not been accompanied by parallel advances in therapies.

Here we describe a new therapeutic strategy for treatment of portosystemic collateralization in portal hypertension. This treatment is based on short interfering RNA (siRNA) technology^{24–26}, which has broad potential as a therapeutic to attenuate production of specific target proteins *in vivo* and for the treatment of disease. It has in fact emerged as one of the most promising platforms for therapeutic product development. In particular, we have developed highly effective siRNA sequences against KDR (siRNA^{KDR}), which have been chemically modified to provide stability in the bloodstream and evasion of the immune system. These siRNA^{KDR} have also been encapsulated within clinically suitable delivery materials to form siRNA^{KDR}-lipoplexes, which not only preserve biological activity but also enhance stability and systemic delivery specifically to vascular endothelial cells^{27–32}. Our results demonstrate the efficacy of this improved treatment modality to specifically knockdown the disease-induced KDR overexpression, and robustly attenuate the severity of portosystemic collateral vessels in a murine model of portal hypertension. Of interest, a related type of formulation that we have also developed has been shown to be viable and well tolerated for systemic siRNA administration and is currently being evaluated in clinical trials for treatment of patients with advanced solid tumors³¹, further supporting the translational relevance and therapeutic potential of this approach for portal hypertension and chronic liver disease in a clinical context. Given the emerging roles of angiogenesis in a number of human pathologies, including inflammation, obesity and tumor growth, siRNA^{KDR}-lipoplexes may provide a novel strategy to treat a wide spectrum of diseases.

Methods

Additional methods described in online supplementary information include: Immunoblotting, and RNA isolation and real-time reverse transcriptase (RT)-PCR analysis.

***In vitro* siRNA transfection.** siRNAs targeting human and mouse KDR were identified by *in silico* selection based on siRNA algorithm developed at Silence Therapeutics and functional *in vitro* tests initially performed in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Fig. 1A and B; full blots are shown in Supplementary Fig. S1). siRNAs that were used in this study are listed in Fig. 1C. They were synthesized by Biospring/Frankfurt a.M. Further *in vitro* siRNA transfection experiments were done in the murine endothelioma H5V endothelial cell line^{33–35}. H5V cells were seeded on 6-well plates in 10% DMEM medium containing 10% fetal bovine serum, and incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. When cultures reached 60% confluence, gene-specific siRNA-lipoplexes were prepared by mixing siRNA and lipids (AtuFECTTM) and added to cells at a final concentration of 80 nM. Each transfection was performed in triplicate. Two different sequences of siRNA^{KDR} were used (siRNA^{KDRa} and siRNA^{KDRb}; Fig. 1C). Empty liposome without siRNA and unrelated luciferase siRNA (siRNA^{Luc}) were used as controls to distinguish sequence-specific silencing from non-specific effects. In particular, the siRNA^{Luc} control is designed to have no known target in the cells being used (obviously the firefly luciferase gene is not present in mouse cells). Following incubation at 37°C for 4 h, the culture medium was replaced with 2 mL of fresh medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were cultured under standard conditions for a further 48 h before being examined by real time PCR and immunoblotting to assess efficacy of gene silencing.

***In vitro* Matrigel tube formation assay.** To analyze capillary tube-formation, ice-cold Matrigel (300 µL/well; BD Corning) was poured into 24-well culture plates and allowed to gel at 37°C for 1 h. After 72 h of transfection, H5V cells (100,000 cells/well) were plated in fresh medium (DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin) and incubated for 16 h at 37°C and 5% CO₂. Then, cells were examined by phase-contrast microscopy and photographed at 25X and 50X. Tube formation was evaluated and scored as previously described³⁴: (0) individual cells, well-separated; (1) cells begin to migrate and align themselves; (2) capillary tubes visible, no sprouting; (3) sprouting of new capillary tubes visible; (4) closed polygons begin to form; (5) complex mesh-like structures develop. Several random view-fields (4–8) per well were examined and the values averaged.

Animal model of portal hypertension. Portal hypertension was induced in male BALB/C mice weighing 25–30 g (Charles River) by partial portal vein ligation (PPVL)^{7,34}. Under isofluorane anesthesia, a midline abdominal incision was made. The portal vein was separated from surrounding tissue, and a calibrated constriction was performed using a single ligature of 5–0 silk tied around the portal vein and a blunt-tipped 27-gauge needle. The needle was then removed, leaving a calibrated constriction of the portal vein. In sham-operated control mice, the portal vein was similarly manipulated but not ligated. All animals' studies were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committees of the University of Barcelona, and were complied with the National Institute of Health (NIH) guidelines on handling of experimental animals.

Intravenous administration of siRNA-lipoplexes. For *in vivo* studies, we used AtuPLEX2, a derivative of our previously described and characterized siRNA-lipoplex formulation AtuPLEXTM^{27,36}. Briefly, AtuPLEX2 is composed of the cationic lipid system AtuFECT01 (β-L-arginyl-2,3-L-diaminopropionic acid-N-palmityl-N-oleyl-amide trihydrochloride), cholesterol and ceramide C8 Peg (N-octanoyl-sphingosine-1-{succinyl[methoxy(polyethylene glycol)2000]}) in a molar ratio of 70:29:1, and blunt ended siRNA duplexes chemically stabilized by alternating 2'-O-methyl, 2'-fluoro modification on both strands (Fig. 1C). The formulation was prepared in 270 mmol/L sucrose. AtuPLEX2 particles display a Z-average size of 30-nm with a polydispersity index of 0.273 as determined by dynamic light scattering (Fig. 2A and B). AtuPLEX2 prepared with KDR-targeted siRNAs (siRNA^{KDR}-lipoplexes) was intravenously injected into the tail vein of male BALB/c

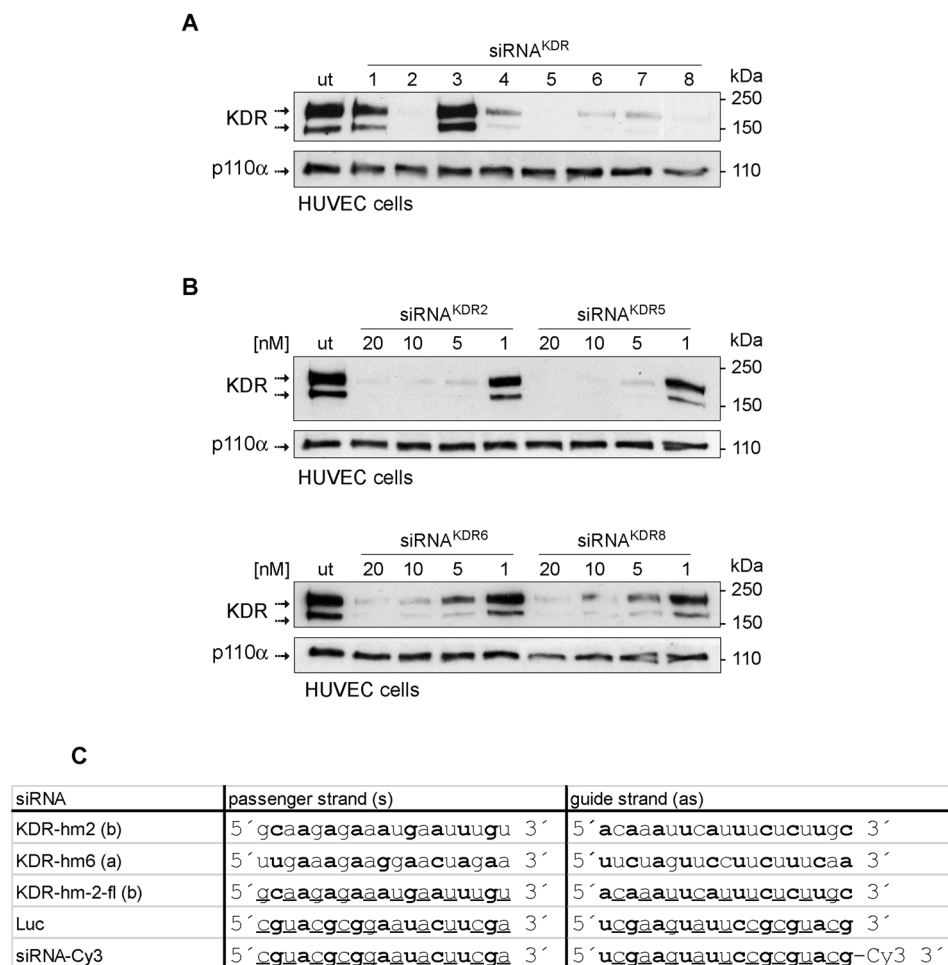


Figure 1. *In vitro* test of in silico selected siRNAs molecules for targeting KDR. (A) Human umbilical vein endothelial cells (HUVECS) were seeded in 6 well dishes at a density of 50,000 cells/well and transfected with 20 nM siRNA and 1 µg/mL AtuFECT as indicated. Two days after transfection cells were lysed and KDR expression was evaluated by immunoblotting analysis with KDR antibodies. Several siRNAs reduced expression of KDR. Expression of the house keeping gene p110α was not affected the siRNA transfections and was used as loading control. (B) Dose-dependent inhibition of KDR protein expression by selected KDR siRNAs. HUVECS were transfected with 20, 10, 5 and 1 nM of the selected siRNAs and AtuFECT at a constant siRNA to lipid ratio of 20 nM siRNA and 1 µg/mL lipid. Strongest reduction of KDR expression was observed by treatment with siRNA^{KDR2}. (C) siRNA sequences used in this study. Nucleotides with 2'Ome modification are depicted in bold letters, nucleotides with 2'-fluoro modification are underlined. Whole blots are shown in Supplementary Fig. S1.

mice (n = 15), as described before²⁸. AtuPLEX2 prepared with unrelated luciferase siRNAs (siRNA^{Luc}-lipoplexes) was injected in control mice (n = 17). siRNA-lipoplex solution contained 0.28 mg/mL siRNA and 2.37 mg/mL lipid (equivalent to a dose of 2.8 mg/kg siRNA and 23.7 mg/kg lipid). Injections were given at a low volume of 300 µL/30 g mouse, using a 1-mL syringe attached to a 27 G needle. siRNA-lipoplexes were diluted in 270 mmol/L sucrose to keep the administration volume of 300 µL/30 g mouse constant. For visualization of cellular uptake *in vivo*, portal hypertensive mice were treated with a single tail vein injection of AtuPLEX2 prepared with siRNA molecules labeled with the fluorophore Cy3 (2.8 mg/kg)^{27,28}. Organs were harvested 60-min later, and fluorescence patterns were analyzed in paraffined tissue sections by high-resolution confocal fluorescence microscopy. For determination of the silencing capability of siRNA^{KDR}-lipoplexes *in vivo*, in mice with portal hypertension, animals were treated with four tail-vein injections of siRNA^{KDR}-lipoplexes or siRNA^{Luc}-lipoplexes, on consecutive days, starting immediately after portal hypertension induction. Studies and blood and organs collection were performed one day after the last injection.

For determination of blood chemistry parameters, blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C to obtain plasma. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin, creatinine and urea were subsequently evaluated by standard protocols using a Spinreact Spinlab 100 chemistry analyzer.

Determination of the extent of portosystemic collateral formation. The extent of portosystemic collateral vessels was quantified using the coloured microsphere technique^{7,34}. Under anesthesia with iso-fluorane (3.5% for induction; 1.5% for maintenance), a tracheostomy was performed and a polyethylene tubing

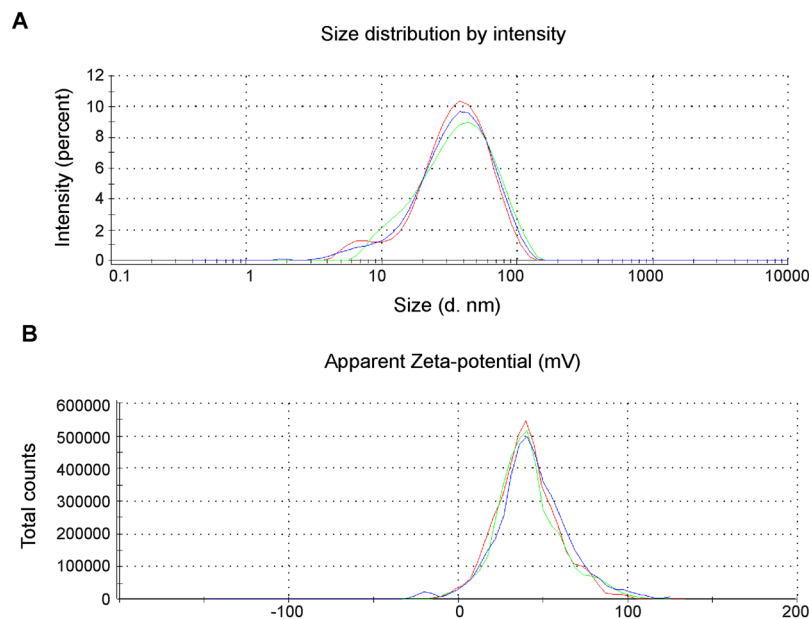


Figure 2. Physico-chemical characterization of AtuPLEX2. AtuPLEX2 lipoplex is composed of 70 mol% cationic lipid AtuFECT01, 1 mol% CerC8 PEG, 29% cholesterol and blunt ended siRNA duplexes with alternating modifications on both strands. **(A)** Size distribution: Z-average size of 29 nm as determined by dynamic light scattering (intensity distribution), measured in 270 mmol/L sucrose buffer, in triplicates. **(B)** The Zeta potential of representative lipoplexes has its peak at 42.1 mV, measured in 270 mmol/L sucrose buffer, in triplicates.

(Clay-Adams Inc, New York, NY) was inserted into the trachea to ensure a patent airway. Then, an abdominal midline incision was performed. Approximately 150,000 yellow polystyrene latex microspheres (15- μ m diameter, Dye-trak; Triton Technologies) were injected into the spleen of each animal. After waiting 5 min to allow a sufficient distribution of the microspheres through the whole body, mice were sacrificed and the lungs and liver were removed, cleaned and weighed. Microspheres were recovered from tissues by digestion and precipitation, following manufacture's instructions. Blue microspheres (\approx 10,000) were used as control recovery in each tube. Dye concentration in microspheres was determined by spectrophotometry (670 nm for blue microspheres and 440 nm for yellow microspheres). Extent of collateralization was calculated as the percentage of microspheres in the lungs compared to lung and liver combined.

To estimate portosystemic collateral blood flow, the superior mesenteric artery was dissected free from connective tissue, and a nonconstrictive perivascular ultrasonic flowprobe (Transonic Systems, New York, NY) was placed around this vessel close to its aortic origin. The ultrasonic flowprobe was connected to a small animal T206 blood flowmeter (Transonic Systems) to measure blood flow in the superior mesenteric artery (SMABF, mL/min/10 g body weight) by the ultrasonic transit-time technique using ADI Chart software^{9,10}. This method involves a perivascular flowprobe, which contains two ultrasonic transducers that emit a plane wave of ultrasound back and forth, alternatively intersecting the flowing blood in upstream and downstream directions. The flowprobe subtracts the downstream from the upstream integrated transit times, and this difference is a measure of the volume of blood flow (mL/min). Rectal temperature was maintained at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ throughout the study. Portosystemic collateral blood flow (mL/min/10 g body weight) was estimated as SMABF \times extent of portosystemic collaterals/100, as previously described³⁷.

Histological analyses and immunohistochemistry. Tissues were fixed in 10% buffered formalin solution and embedded in paraffin. Successive 2- μ m sections were obtained and prepared for histological H&E staining, according to standard protocols. For immunostaining, after deparaffination and rehydration, sections were heated in a pressure cooker (in 10 mM citrate buffer, pH6.0, 5-min) for epitope retrieval, and treated with 3% hydrogen peroxide for 10-min at room temperature to inhibit endogenous peroxidase activity. Slides were blocked with 5% goat serum for 1 h, and then incubated with primary antibodies against KDR (1:50 dilution; sc-6251, Santa Cruz), Ki67 (1:25 dilution; ab16667, Abcam) or vWF (1:1000 dilution; A0082, DAKO) at 4°C , overnight. Sections were then washed in TBST and incubated 30-min at room temperature with Dako Real EnVision Detection System (HRP mouse/rabbit secondary antibody). Antibody binding was revealed using hydrogen peroxide as substrate, and diaminobenzidine as chromogen. Hematoxylin was used as counterstain. For negative control, primary antibody was omitted and sections were incubated with the corresponding secondary antibody and detection systems. Stained sections were visualized with a Zeiss microscope. Images from several regions of the tissue or vessel sections were then acquired using an AxioCam camera (Carl Zeiss Vision, Germany). Analysis of digitalized images was performed with computerized imaging system (AxioVision and Image J).

Immunofluorescence and confocal laser microscopy. For *in vivo* uptake studies of fluorescently labeled siRNAs (Cy3-siRNAs), paraffin embedded 2- μ m sections were deparaffined, rehydrated and stained with DAPI (H-1200 Vector Burlingame, CA). Then, sections were directly examined by epifluorescence with a confocal laser-scanning microscope. For coimmunostainings, paraffin sections were deparaffined, rehydrated, blocked with 5% goat serum and then incubated overnight at 4 °C with primary antibody against CD31 (1:50 dilution; sc-1506R; Santa Cruz). For fluorescence visualization of immunolabeling, a fluorescently labeled secondary (Alexa Fluor-647) was used (A31573; Invitrogen, Carlsbad, CA). Nuclei were counterstained with DAPI. Photomicrographs were taken with a confocal laser-scanning microscope, using QImaging digital camera and Imaging ProPlus software. All images were captured using similar confocal microscopy settings.

Quantification of tissue vascularization. To quantify vascularization on tissue sections, blood vessels were first detected by vWF immunostaining. Digital images of different microscopic fields of each mesenteric tissue were then acquired using a Zeiss microscope and an AxioCam colour digital camera (Carl Zeiss Vision). Zeiss Axio Vision image analysis system (Zeiss) and IPLab software (BioVision Technologies) were used for computerized quantification of immunostained vascular structures. Total number of vWF-positive blood microvessels was counted across entire mesenteric sections and divided by the section area to give total mean blood microvessel density for each group. Results were expressed as number of vessels per square millimeter. Sections were examined independently by 2 blinding investigators, experts in the field, who were unaware of the samples' profiles.

Determination of vascular endothelial cell proliferation. To identify proliferating endothelial cells in mesenteric vessels, we used monoclonal antibodies to the nuclear non-histone antigen Ki67. Total number of Ki67-positive endothelial cells per blood vessel was counted in high power fields (original magnification \times 200) and expressed as percentage of the total number of endothelial cells in that field. Mitotically quiescent endothelial cells were easily recognized by the lack of Ki67 immunoreactivity, the counterstaining with hematoxylin (which stains the nuclei in blue) post-immunohistochemistry, and their location as a single cell layer lining the interior surface of blood vessels.

Statistical analysis. Data are shown as mean \pm SEM. Results that were normally distributed ($P > 0.05$ from Kolmogorov-Smirnov test) were compared with parametric statistical procedures (Student t test and ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons). Non-normally distributed results were compared with non-parametric tests (Kruskal-Wallis one-way ANOVA and Mann-Whitney-U test). Significance was accepted at $p < 0.05$.

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

Results

KDR-dependent endothelial tubulogenesis is blocked by siRNA^{KDR} *in vitro*. To validate the efficacy of the designed siRNA^{KDR} sequences in downregulating KDR levels, we conducted initial functional *in vitro* experiments in primary human endothelial cells isolated from umbilical vein (described in Methods and Fig. 1), and also in the murine immortalized heart H5V endothelial cell line as an appropriate model of pathologic or activated endothelial cell^{33–35}. H5Vs are transformed and tumorigenic endothelioma cells that differ considerably from their normal counterparts, being highly proliferative and constitutively expressing high levels of VEGF and KDR^{33–35}. Mouse endothelioma H5V cells were transfected with two different siRNA sequences specifically targeting mouse KDR (siRNA^{KDRa} and siRNA^{KDRb}). Cells transfected with a Luciferase-specific siRNA (siRNA^{Luc}) and cells treated with empty liposome without siRNA (no-siRNA) served as controls. KDR mRNA expression was determined 48 h posttransfection by real-time PCR. We found that transfection with siRNA^{KDR} markedly decreased KDR mRNA by 83% (siRNA^{KDRa}) and 76% (siRNA^{KDRb}), compared with control siRNA^{Luc} (Fig. 3A). There was no difference in KDR mRNA expression between siRNA^{Luc}-treated cells and cells treated with empty liposome. We corroborated specific decrease of KDR by immunoblotting. KDR protein levels were significantly reduced in H5V cells after treatment with siRNA^{KDRa} (67% decrease) and siRNA^{KDRb} (77% decrease), as compared with control siRNA^{Luc} (Fig. 3B; full blots are shown in Supplementary Fig. S2A). In agreement with data in the literature³⁸, two monomeric bands were typically observed in KDR immunoblots at 230 kDa and 200 kDa, corresponding to partially and fully glycosylated KDR variants. β -Actin protein expression showed no difference between groups. These results revealed successful transfection of siRNA^{KDR} into activated H5V endothelial cells and specific reduction of KDR expression at the protein and mRNA levels.

We further studied the KDR loss-of-function phenotype by performing vasculogenic tube formation assays *in vitro* in H5V cells transfected with siRNA^{KDR}, control siRNA^{Luc}, or empty liposome. We found that knockdown of KDR following transfection with siRNA^{KDR} dramatically diminished the capability of H5V cells of forming network/tube-like structures on Matrigel *in vitro* (Fig. 3C and D), compared with controls. Thus, complex mesh-like structures with closed polygons developed only in H5V cells transfected with siRNA^{Luc} or empty liposome, but not in those transfected with siRNA^{KDR} (Fig. 3C and D). Tube formation was unaffected by the transfection of control siRNA^{Luc}. Collectively, these data indicate that the reduction in KDR synthesis obtained by the siRNA^{KDR} transfection *in vitro* in activated endothelial cells resulted in the expected biological effects on KDR expression and endothelial tube formation.

Specific uptake of siRNA-lipoplexes into vascular endothelium in portal hypertensive mice. To address the therapeutic efficiency of siRNA^{KDR}, we performed studies in a murine model of portal hypertension induced by partial portal vein ligation (PPVL). This is an ideal animal model to study pathological angiogenesis and portosystemic collateralization in the portal hypertensive syndrome, as it has been extensively demonstrated^{7–12}. For these *in vivo* experiments, we developed a novel siRNA delivery system based on

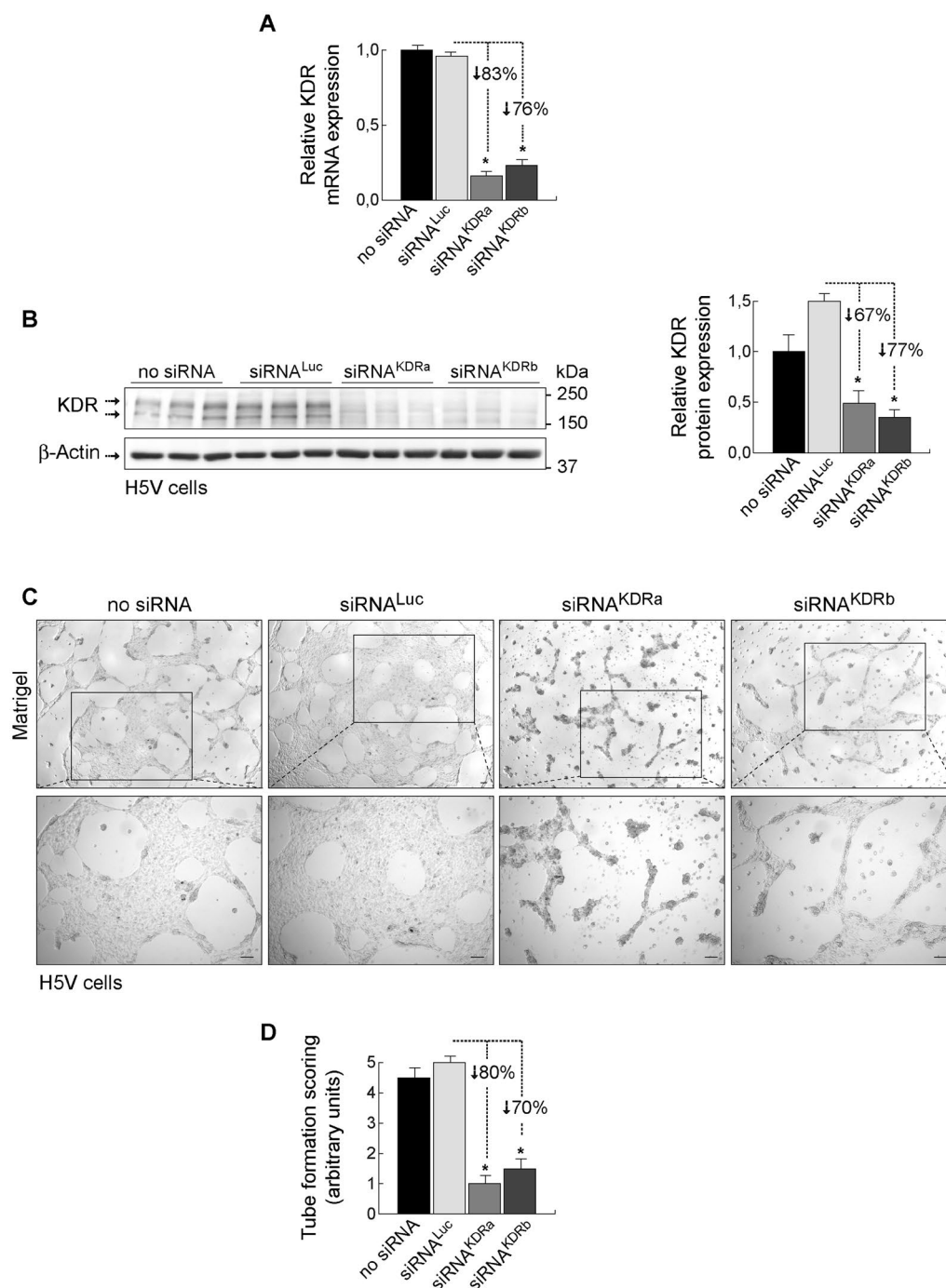


Figure 3. Loss-of-function analysis of KDR-specific siRNAs in murine endothelioma H5V cells. Murine endothelioma H5V cells were transfected with two different KDR targeting siRNA sequences (siRNA^{KDRa} and siRNA^{KDRb}). Cells transfected with a luciferase-specific siRNA (siRNA^{Luc}) or with empty liposome served as negative controls. **(A)** Relative KDR mRNA expression (mean \pm SEM), normalized to endogenous control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), determined by real-time RT-PCR in H5V cells. **(B)** Knockdown analysis for KDR protein expression determined by immunoblotting in H5V cells. Detection of β -actin served as control for equal protein loading. KDR immunoblots show the two typical monomeric bands at 230 kDa and 200 kDa, corresponding to partially and fully glycosylated KDR variants. Densitometric quantification of protein expression (mean \pm SEM) is also shown. Whole blots are shown in Supplementary Fig. S2A. **(C)** *In vitro* angiogenesis assay in H5V cells seeded on Matrigel. Following transfection with siKDR, KDR knockdown H5V cells (i.e., H5V cells transfected with siRNA^{KDR}) had diminished ability to form tubular structures compared with cells transfected with siRNA^{Luc} or empty liposome. Images at the bottom show high magnification of boxed area from top images. Scale bars: 100 μ m. **(D)** Tube formation was evaluated and scored (mean \pm SEM) as previously described³⁴: (0) individual cells, well-separated; (1) cells begin to migrate and align themselves; (2) capillary tubes visible, no sprouting; (3) sprouting of new capillary tubes visible; (4) closed polygons begin to form; (5) complex mesh-like structures develop. * $p < 0.01$ versus siRNA^{Luc}-transfected control cells.

AtuPLEX™ technology (Silence Therapeutics, Berlin, Germany). siRNAs against KDR were chemically modified to strengthen their stability and ability to suppress the target gene effectively^{27–32}. These therapeutic siRNAs were also encapsulated within liposomes to form siRNA lipoplex particles, which protect siRNAs from ribonucleases and shear degradation in the bloodstream, and facilitate their transfer across cellular membranes upon intravenous systemic administration. Due to specific lipid compositions, physico-chemical properties and cationic charge, AtuPLEX formulations confer targeting specifically to vascular endothelial cells, a prerequisite for mediating therapeutic KDR silencing^{27–32,36}. Here we examined a new derivative of AtuPLEX, AtuPLEX2. To monitor the delivery of siRNA^{KDR}-lipoplexes to the vascular endothelium *in vivo*, we used AtuPLEX2 lipoplexes formulated with cyanine dye (Cy3)-labeled nonsilencing siRNA. These siRNA-Cy3-lipoplexes were administered intravenously via tail-vein injection in mice, at day 5 after induction of portal hypertension. We have previously demonstrated the existence of a time-dependent increase in the amount of splanchnic blood vessels, with a clear upregulation of the endothelial cell marker CD31 at day 5 after portal hypertension induction in mice⁷. Tissues of interest (mesenteric microvasculature and portal vein draining from mesenteric veins, in which the proangiogenic VEGF-KDR signaling pathway plays a pivotal pathological role in portal hypertension^{7–12}) were harvested 60 min later, and the red fluorescent Cy3-labeled siRNAs were visualized by confocal microscopy. We found considerable siRNA-related fluorescence in mesenteric vessels and intrahepatic portal vein (Fig. 4A and B; negative controls for immunofluorescence are shown in Supplementary Fig. S3). Upon close-upview, siRNA staining often appeared as punctuate structures around nuclei of vascular endothelial cells (Fig. 4A and B), this observation being indicative for intracellular uptake of siRNAs. To analyze in more detail the specific endothelial targeting of siRNA-Cy3-lipoplexes, we carried out double immunofluorescence of Cy3 and the endothelial cell marker CD31³⁹. Confocal microscopy of mesenteric microvessels showed that the distribution of expression of siRNA-Cy3 and endogenous CD31 markedly overlapped in microvascular endothelium (Fig. 4C and D). Notably, siRNA-Cy3 accumulated mainly in the endothelium of newly-formed vessels and preexisting microvenules of the mesentery (Fig. 4A and C–E), while very little accumulation of these particles was observed in mesenteric microarterioles (Fig. 4E), even if these vessels are first exposed to the siRNA-liposomes before passing through capillaries and entering the venous circulation, considering the circulation route of liposomes post-tail vein administration. Furthermore, the Cy3-derived fluorescence was clearly absent from other mesenteric vascular cell types which are not endothelial cells (vascular smooth muscle cells and adventitial cells for example) and from non-vascular structures of the mesentery (such as adipocytes) (Fig. 4A–E), implying that the vasculature and, in particular the endothelial cells, were the preferred cellular target structures, minimizing exposure of other cells. See Supplementary Fig. S4 for illustration of the histology of mouse mesentery, highlighting the difference between preexisting vessels (preexisting microvenules and microarterioles), which readily distinguished from neovessels by their notoriously smaller caliber and thinner vascular wall. Furthermore, fluorescence was not detectable in mice not injected with siRNA-Cy3-lipoplexes, except for the autofluorescent erythrocytes in the vessel lumen, demonstrating that the light emissions observed in the mesenteries injected with labeled siRNA were not due to autofluorescence produced by the tissue (Supplementary Fig. S3). These findings confirm the capacity of the lipoplex formulation to efficiently deliver siRNA cargo *in vivo* to endothelial cells of mesenteric microvenules and portal vein.

Effective silencing capability of siRNA^{KDR}-lipoplexes in mice with portal hypertension. Having demonstrated the uptake of siRNAs by the specific cell type of interest, we further determined their ability to specifically knockdown the endogenous (over)expression of KDR, which is a hallmark of portal hypertension that contributes to disease progression and aggravation^{6–12}. First, we confirmed that the expression of KDR was very low under baseline physiologic conditions in sham-operated control mice, but was strongly upregulated in mesenteric microvenules and neovessels upon portal hypertension induction ($p < 0.05$), as indicated by immunoblotting and immunohistochemistry (Fig. 5A and B; full blots are shown in Supplementary Fig. S2B). This KDR overexpression was efficiently and significantly reduced (by 75%, $p = 0.0014$) after systemic treatment with siRNA^{KDR}-lipoplexes (four tail-vein injections on consecutive days, starting immediately after portal hypertension induction) (Fig. 5C), compared with mice treated with unrelated Luciferase siRNA lipoplexes (siRNA^{Luc}-lipoplexes) (Fig. 5D; full blots are shown in Supplementary Fig. S2C). Notably, siRNA^{KDR}-lipoplex treatment did not totally abolish expression of the KDR protein in mice with the current dosing regimen (Fig. 5D). Basically, KDR expression was knocked down but not knocked out, which is preferable to preserve basal levels of KDR to maintain vascular homeostasis of healthy vessels^{16–20}. Accordingly, and under the conditions and dosage employed here, no gross side effects, for example no diarrhea, weakness or morbidity, were observed during the experiments. There were also no behavioral changes, such as eating and drinking habits and mobility in animals treated with liposomal siRNA preparations, both those that are nonsilencing and those targeting KDR. We identified comparable body weight loss in both groups (7.9% in the siRNA^{KDR}-lipoplex group and 7.5% in the siRNA^{Luc}-lipoplex group) (Fig. 6A). Note however that treatment runs in parallel with recovery from surgery, so this body weight loss can be due to the surgery and not to the siRNA lipoplex treatment. In addition, we found neither signs of altered liver function [alanine aminotransferase (ALT, $p = 17$), aspartate aminotransferase (AST, $p = 0.37$), and albumin ($p = 0.24$) plasma levels] nor evidence of inflammation or histologic toxicities in the liver [protein expression of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF α ; $p = 0.4$), and H&E staining] after treatment with siRNA^{KDR}-lipoplexes or control siRNA^{Luc}-lipoplexes (Fig. 6B–D; full blots are shown in Supplementary Fig. S2D). There were also no signs of altered renal function [plasma levels of creatinine ($p = 0.45$), and urea ($p = 1$)] (Fig. 6E). The size of the spleen was also not affected by the treatments (Fig. 6F), which may be indicative of a lack of general inflammatory response⁴⁰. Furthermore, the expressions of the proteins β -actin and GAPDH, used as loading controls, were unaffected in response to siRNA^{KDR}-lipoplex treatment or in response to siRNA^{Luc}-lipoplex treatment (Figs 5D and 6C), implying that there was no global cell loss or protein synthesis downregulation after siRNA administration. These findings together indicate that

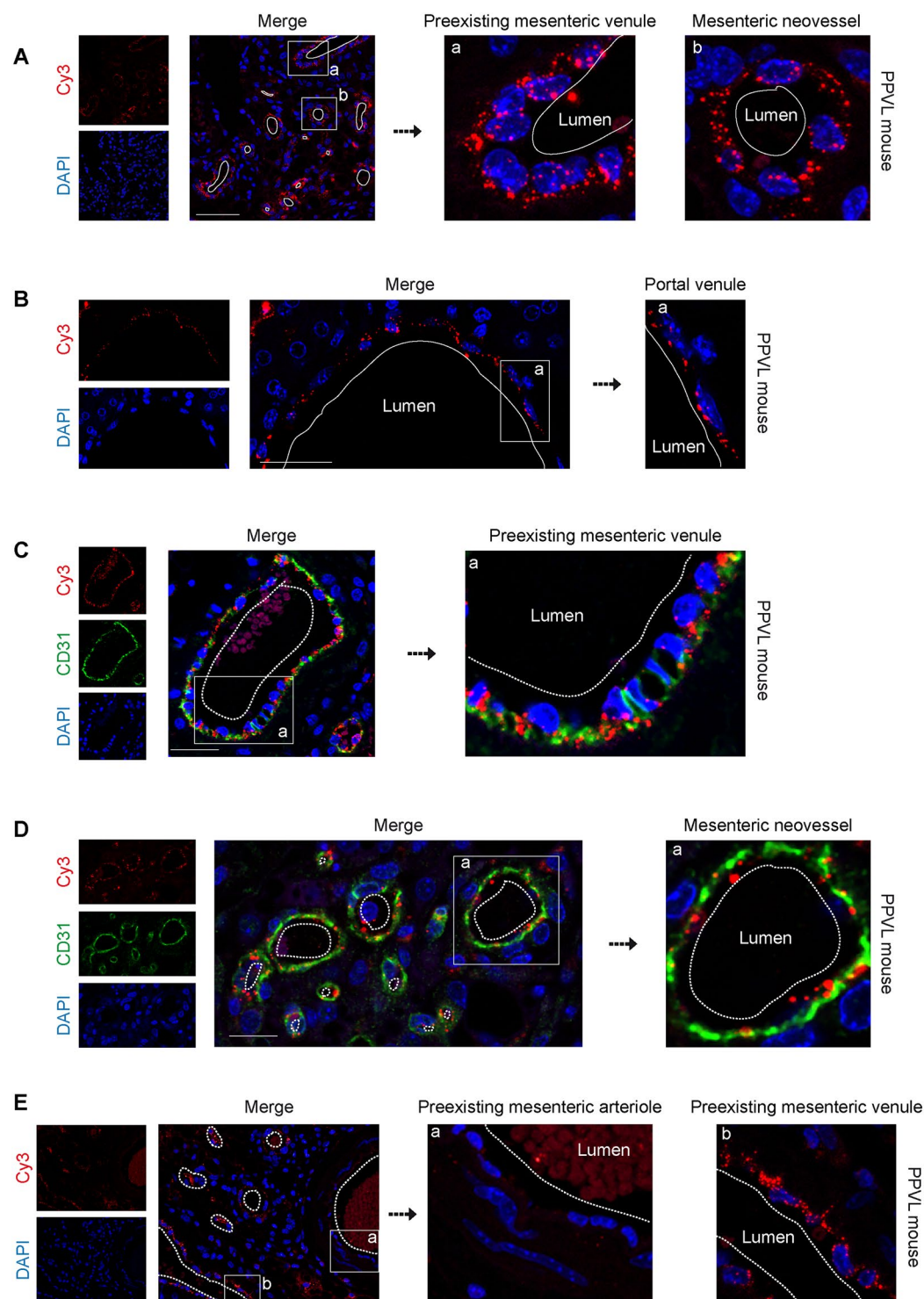


Figure 4. Intracellular localization of siRNA-Cy3-lipoplexes in the vascular endothelium of mesenteric microvessels and portal vein in portal hypertensive mice. The localization and cell-type specific uptake of lipoplexed siRNAs by the vascular endothelium *in vivo* was evaluated using fluorescently-labeled siRNA-Cy3-lipoplexes. These particles were intravenously injected in portal hypertensive mice, at day 5 after portal vein ligation (PPVL) and tissues were harvested 60 min later. Nuclei were stained with DAPI (blue). (A,B) High resolution confocal microscopy showing the intracellular localization of intravenously administered siRNA-Cy3-lipoplexes (Cy3 fluorescence; red) in vascular endothelial cells of preexisting microvenules and neovessels of the mesentery (A), as well as in the endothelium of intrahepatic portal venules (B). The Cy3-derived fluorescence was absent from non-vascular structures. Boxed areas are magnified to see that the distribution of the siRNA-Cy3-lipoplexes appears as punctuate fluorescent particles around the cell nuclei in the vascular endothelium. (C,D) The specific endothelial targeting shown in panels A and B was examined by double immunofluorescence of Cy3 and the endothelial cell marker CD31 and confocal microscopy.

(C) Immunofluorescence staining with anti-CD31 antibodies showed that siRNA-Cy3-lipoplexes (red) were distributed along the CD31-positive endothelial cell lining (green) of the mesenteric preexisting microvenules, in the vicinity of the endothelial nucleus, further demonstrating the endothelial targeting. Close-up view from the indicated area of the merge is also shown. Note autofluorescent erythrocytes in the vessel lumen, and also the typical prominent nucleus of activated endothelial cells in mesenteric microvessels after portal hypertension induction. (D) The siRNA-Cy3-lipoplexes (red) also associated intimately with the CD31-labeled endothelial cells (green) of neovessels, suggesting again a strong internalization of these molecules to the microvascular endothelial cells in newly-formed mesenteric vessels. Nuclei were stained with DAPI (blue). Close-up view from the indicated area of the merge is also shown. (E) Mesenteric preexisting arteriole-venule pair showing poor or no fluorescent siRNA-Cy3-lipoplex labeling in the arteriole compared with microvenule and neovessels. Close-up views from the indicated area are also shown. Scale bars: 50 μ m. See also Supplementary Fig. S3 (negative controls for immunofluorescence) and Supplementary Fig. S4 (H&E-stained mesenteric sections).

siRNA^{KDR}-lipoplexes were not only intravenously delivered to the targeted vascular endothelial cells, but also reached sufficient therapeutic concentration to produce specific KDR knockdown, without adverse effects, in portal hypertensive mice. Of note, we have invested considerable effort in optimizing the RNA interference technology for functional studies and *in vivo* testing. Thus, all siRNAs used in this study were rigorously and thoroughly examined for potential off-target effects by bioinformatic analyses. Only sequences with 100% sequence identity to the target were selected; sequences with sequence similarity to other targets (with more than 16 out of 19 base pairs matches) were excluded; and all siRNAs were excluded when seed region matched to miRNA seed sequences (miRbase). Even more weight was put on the analysis of potential off-targets expressed in the vasculature. In addition, and as described in Methods, siRNAs were modified by alternating 2' O methyl modifications and 2' fluoro modifications, which enhance siRNA stability and reduce Toll-like receptor activation and off-target activities. Furthermore, to exclude that target gene expression was modulated by the liposomal delivery system, control groups were included with liposomal formulations prepared with non-targeting siRNA payloads. Another concern that should be taken into consideration when using siRNAs for therapeutic or scientific purposes is the potential presence of some specific motifs in the siRNA sequence, such as UGGC- and other -AU-rich pentamers, including -AUUUG, GUUUU, AUUUU, CUUUU, UUUUU, GUUUG-, which may induce a toxic phenotype in cells, as described by Fedorov and colleagues⁴¹. One of the sequences used in our study (siRNA^{KDR-hm2b}) contained an AUUUG motif. Of note, though, this motif was present only in the sense, passenger strand (GCAAGAGAAAUGAAUUUGU), but not in the antisense, guide strand (ACAAAUUCAUUUCUCUUGC) (Fig. 1C). This point is relevant because the potential toxicity of the AUUUG motif observed by Fedorov *et al.* occurred only when this was overrepresented in the RNA Induced Silencing Complex (RISC)-entering strand, the guide strand⁴¹. Strand loading of a siRNA duplex is determined by preferential loading of the antisense strand due to thermodynamic asymmetry. The sense strand (passenger strand) of a functional siRNA molecule has usually the more stable 5'-end than the antisense (guide strand). This is also the case with the siRNA^{KDR-hm2b}. The antisense strand contains 3 GC base pairs in the first 5 nucleotides, compared to only one GC in the first 5 nucleotides of the antisense strand. The proposed "toxic motif" AUUUG of the siRNA^{KDR-hm2b} is however located in the sense strand of the siRNA duplex, which is not the preferred strand for RISC loading. To eliminate off-target effects, we have also adopted very stringent siRNA design filters and testing conditions, comparable or even more stringent than in Fedorov's work⁴¹. Thus, while they tested their siRNAs in immortalized tumor cell lines, we tested our siRNA candidates in primary endothelial cell lines, which are considered to be a more relevant model for vascular biology and more sensitive to toxic stimuli. We did not observe cytotoxic effects at up to 20 nM siRNAs transfected. In Fedorov *et al.*, toxic effects were observed at a 10 nM concentration (lipofectamine transfections)⁴¹. In addition, we used two different KDR siRNA sequences for *in vitro* phenotypic characterization. Even though the sequences were different, the same phenotype was observed in the Matrigel assay. Therefore, it is very unlikely that the *in vitro* and *in vivo* effects observed in our present study were due to the potential toxic sequence motifs.

siRNA^{KDR}-lipoplex therapy ameliorates portosystemic collateral growth and pathological neovascularity in portal hypertensive mice. We next proceeded to specifically analyze the effects and therapeutic potential of siRNA^{KDR}-lipoplexes on the portosystemic collateral circulation. To this end, mice were subjected to PPVL to induce portal hypertension, and then treated as previously indicated with four consecutive tail-vein injections of siRNA^{KDR}-lipoplexes or control siRNA^{Luc}-lipoplexes. The extent of portosystemic collateralization was determined by the tracer microsphere technique, as described in the Methods section. This well-established method uses the injection of microspheres into the spleen to measure portosystemic collaterals. When no collaterals are detectable, all microspheres go directly to the liver through the portal vein and remain retained in the liver. However, when portosystemic collateral vessels have developed, microspheres bypass the liver and circulate through the portosystemic collaterals to the lungs, where they remain retained. We found that therapy with siRNA^{KDR}-lipoplexes, initiated early in the course of portal hypertension progression, drastically reduced by 73% the portosystemic collateralization ($p = 0.0002$), compared with siRNA^{Luc}-lipoplex treatment (Fig. 7A). Of note, 80% of the animals in the siRNA^{KDR}-lipoplex group had an almost negligible (<10%) portosystemic collateralization. In comparison, only 6% of the mice in the siRNA^{Luc}-lipoplex group had collateralization of <10%. This effect was paralleled by a marked and significant decrease (by 64%; $p = 0.0049$) in collateral blood flow (Fig. 7B), which can additionally reduce the functional capacity of collaterals by modulating vascular remodeling⁵. It must be noted that the endothelial cell surface KDR receptor is able to perceive changes in blood flow in a ligand-independent manner, acting as a mechanoreceptor that triggers vessel remodeling^{42–45}. Such remodeling, favoured by increased collateral blood flow, is an important mechanism mediating the enlargement and

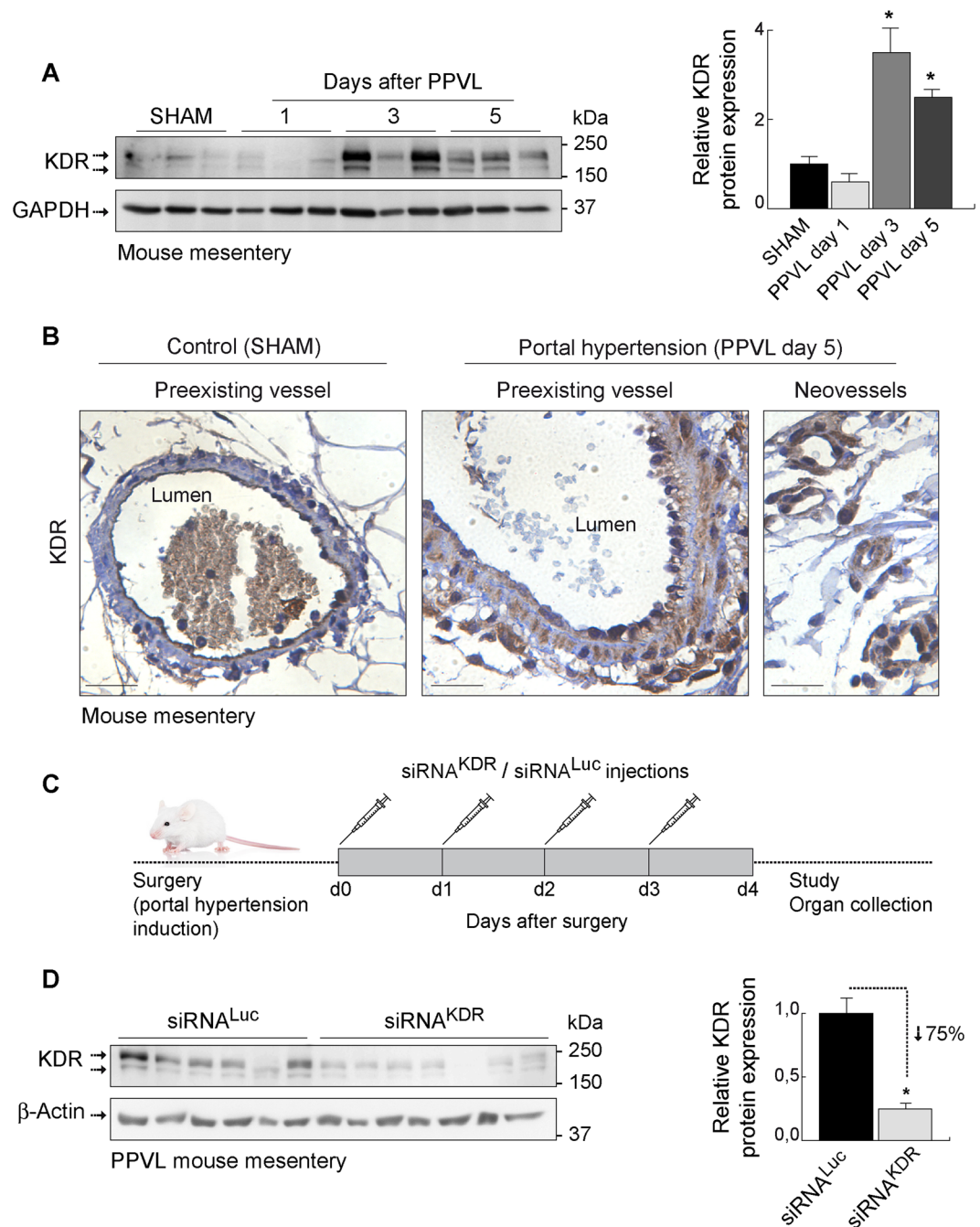


Figure 5. Knockdown of KDR overexpression after siRNA^{KDR}-lipoplex treatment in mice. **(A)** KDR protein expression, determined by immunoblotting, in the mouse mesentery at different time points after portal hypertension induction by partial portal vein ligation (PPVL), and in sham-operated control mice (SHAM). GAPDH was used as loading control. Densitometric quantification of protein expression (mean ± SEM) is also shown. *P* value: **p* < 0.05 versus SHAM mice. Whole blots are shown in Supplementary Fig. S2B. **(B)** Representative immunostainings showing the overexpression of KDR in preexisting microvessels and neovessels in the mesentery of portal hypertensive mice (PPVL day 5) versus SHAM control mice. Note that activated KDR-positive endothelial cells in portal hypertensive vessels are morphologically characterized by being rounded cells that protrude into the vessel lamina, in contrast to the exceedingly thin sheet of flattened resting endothelial cells observed under normal conditions. Scale bars: 25 μm. **(C)** Schematic representation of the schedule of siRNA-lipoplex treatment in mice. **(D)** Representative immunoblotting demonstrating effective reduction of KDR protein expression, by 75%, in the mesentery of siRNA^{KDR}-lipoplex-treated portal hypertensive mice in comparison with siRNA^{Luc}-lipoplex-treated portal hypertensive animals. β-Actin served as loading control. Densitometric quantification of protein expression (mean ± SEM) is also shown. *P* value: ***p* = 0.0014. Whole blots are shown in Supplementary Fig. S2C.

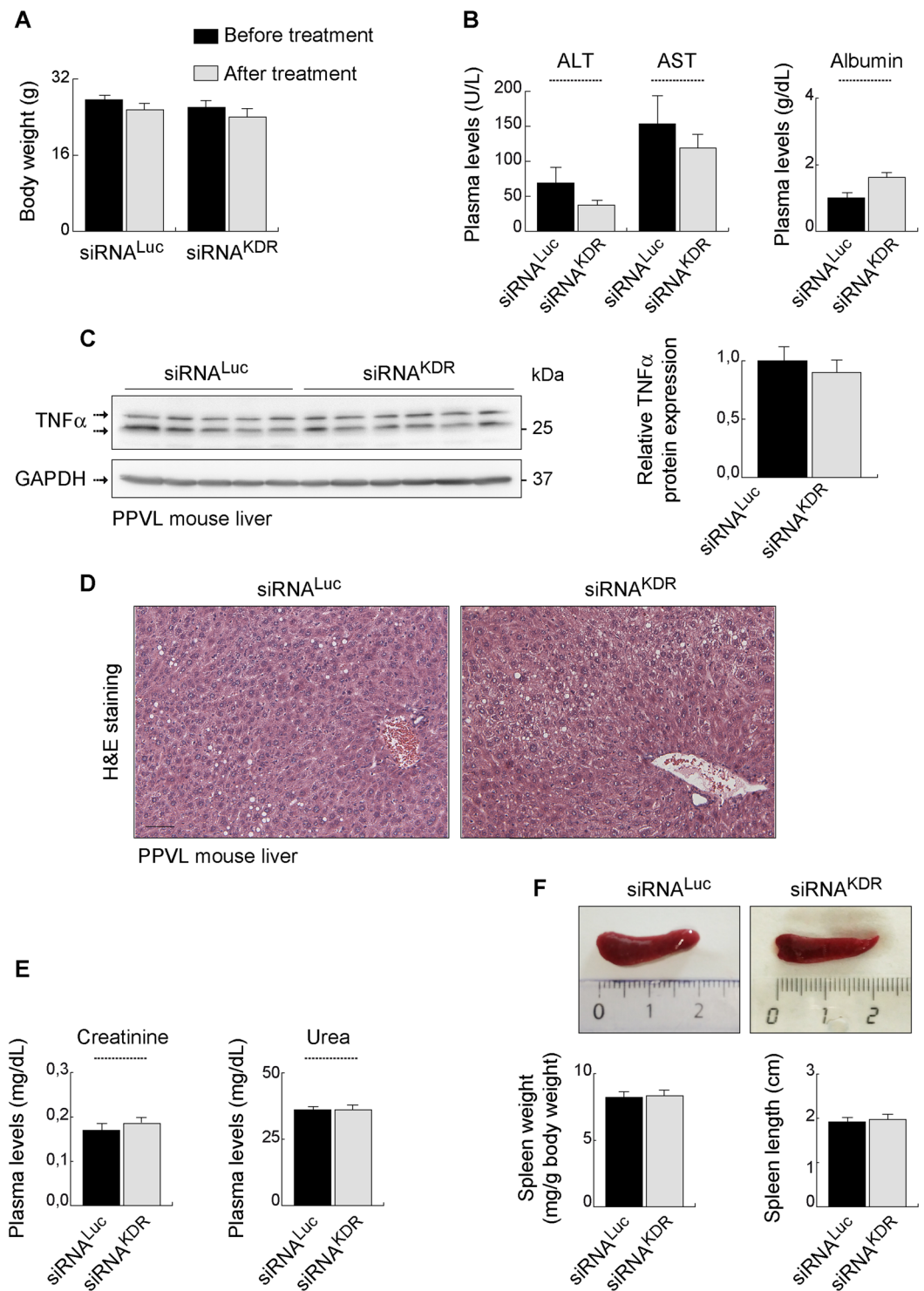


Figure 6. Lack of adverse effects after siRNA^{KDR}-lipoplex treatment in mice. **(A)** Body weight (grams; mean \pm SEM) in portal hypertensive mice, before and after treatment with siRNA^{KDR}- and siRNA^{Luc}-lipoplexes. **(B)** Plasma levels of alanine aminotransferase (ALT, U/L), aspartate aminotransferase (AST, U/L) and albumin (g/dL) in portal hypertensive mice treated with siRNA^{KDR}- or siRNA^{Luc}-lipoplexes. **(C)** Protein expression of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF α , determined by immunoblotting, in the liver of portal hypertensive mice treated with siRNA^{KDR}- or siRNA^{Luc}-lipoplexes. Densitometric quantification of protein expression (mean \pm SEM) is also shown. Whole blots are shown in Supplementary Fig. S2D. **(D)** H&E staining in liver sections from portal hypertensive mice treated with siRNA^{KDR}- or siRNA^{Luc}-lipoplexes. **(E)** Plasma levels of creatinine (mg/dL) and urea (mg/dL) in portal hypertensive mice treated with siRNA^{KDR}- or siRNA^{Luc}-lipoplexes. **(F)** Spleen weight (mg/g body weight) and spleen length (cm) in portal hypertensive mice treated with siRNA^{KDR}- or siRNA^{Luc}-lipoplexes. Macroscopic photographs of representative spleens are also shown. All results are presented as mean \pm SEM.

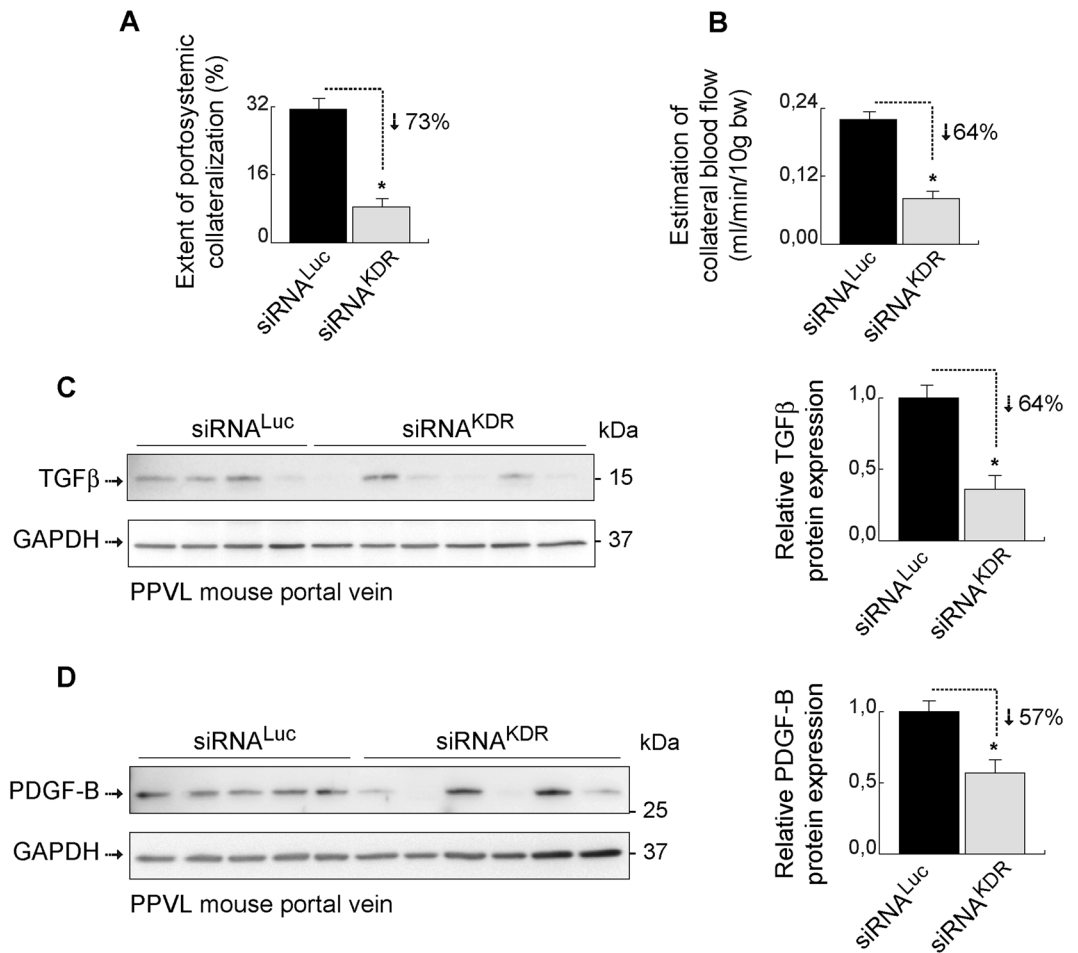


Figure 7. Therapy with siRNA^{KDR}-lipoplexes attenuates portosystemic collateralization. Portal hypertensive mice were treated with four consecutive intravenous injections of siRNA^{KDR}-lipoplexes or control siRNA^{Luc}-lipoplexes after partial portal vein ligation (PPVL). **(A)** Extent of portosystemic collateralization (%; mean \pm SEM) determined by the coloured microsphere technique. *P* value: **p* = 0.0002. **(B)** The blood flow through portosystemic collaterals (mL/min/10g body weight; mean \pm SEM) was estimated from the equation collateral blood flow = superior mesenteric artery blood flow \times shunting/100. *P* value: **p* = 0.0049. Treatment with siRNA^{KDR}-lipoplexes markedly and significantly decreased both the formation of portosystemic collateral vessels, by 73%, and the collateral blood flow, by 64%, in portal hypertensive mice. **(C)** Representative immunoblotting showing that siRNA^{KDR}-lipoplex treatment reduced in 5 out of 6 mice the protein expression of the vascular remodeling marker TGF β (average decrease of 64%; *P* value: **p* = 0.041) in the portal vein, compared with siRNA^{Luc}-lipoplex-treated portal hypertensive mice. GAPDH served as loading control. Densitometric quantification of protein expression (mean \pm SEM) is also shown. Whole blots are shown in Supplementary Fig. S5A. **(D)** Representative immunoblotting showing that siRNA^{KDR}-lipoplex treatment reduced in 4 out of 6 mice the protein expression of the vascular remodeling marker PDGF-B (average decrease of 57%; *P* value: **p* = 0.029) in the portal vein, compared with siRNA^{Luc}-lipoplex-treated portal hypertensive mice. GAPDH served as loading control. Densitometric quantification of protein expression (mean \pm SEM) is also shown. Whole blots are shown in Supplementary Fig. S5B.

maintenance of collateral vessels in portal hypertension^{5,23}. In this respect, we found that siRNA^{KDR}-lipoplex treatment reduced the expression of the recognized vascular remodeling markers^{46–48}, transforming growth factor- β (TGF β , 64% decrease, *p* = 0.041) (Fig. 7C; full blots are shown in Supplementary Fig. S5A) and platelet-derived growth factor-B (PDGF-B; 57% decrease, *p* = 0.029) (Fig. 7D; full blots are shown in Supplementary Fig. S5B), in the portal vein of portal hypertensive mice.

Consistent with these findings, endothelial-specific KDR knockdown in portal hypertensive mice impaired the angiogenic potential of endothelial cells and reduced pathological neovascularization in the mesenteric vascular bed as well. Thus, treatment with siRNA^{KDR}-lipoplexes caused a remarkable 64% diminution (*p* < 0.001) in endothelial cell proliferation (Fig. 8A and B), which precedes the development of new microvessels, as indicated by quantitative analysis of immunostaining with Ki67, a nuclear protein expressed only in proliferating cells, but not in dormant cells⁴⁹. This effect was paralleled by a significant 52% decrease (*p* = 0.0022) in the protein expression of CD31 (Fig. 8C; full blots are shown in Supplementary Fig. S5C), measured by immunoblotting as a marker for endothelial cells³⁹, and a tendency to attenuate (by 39%) mesenteric microvascular density (Fig. 8D and E), as

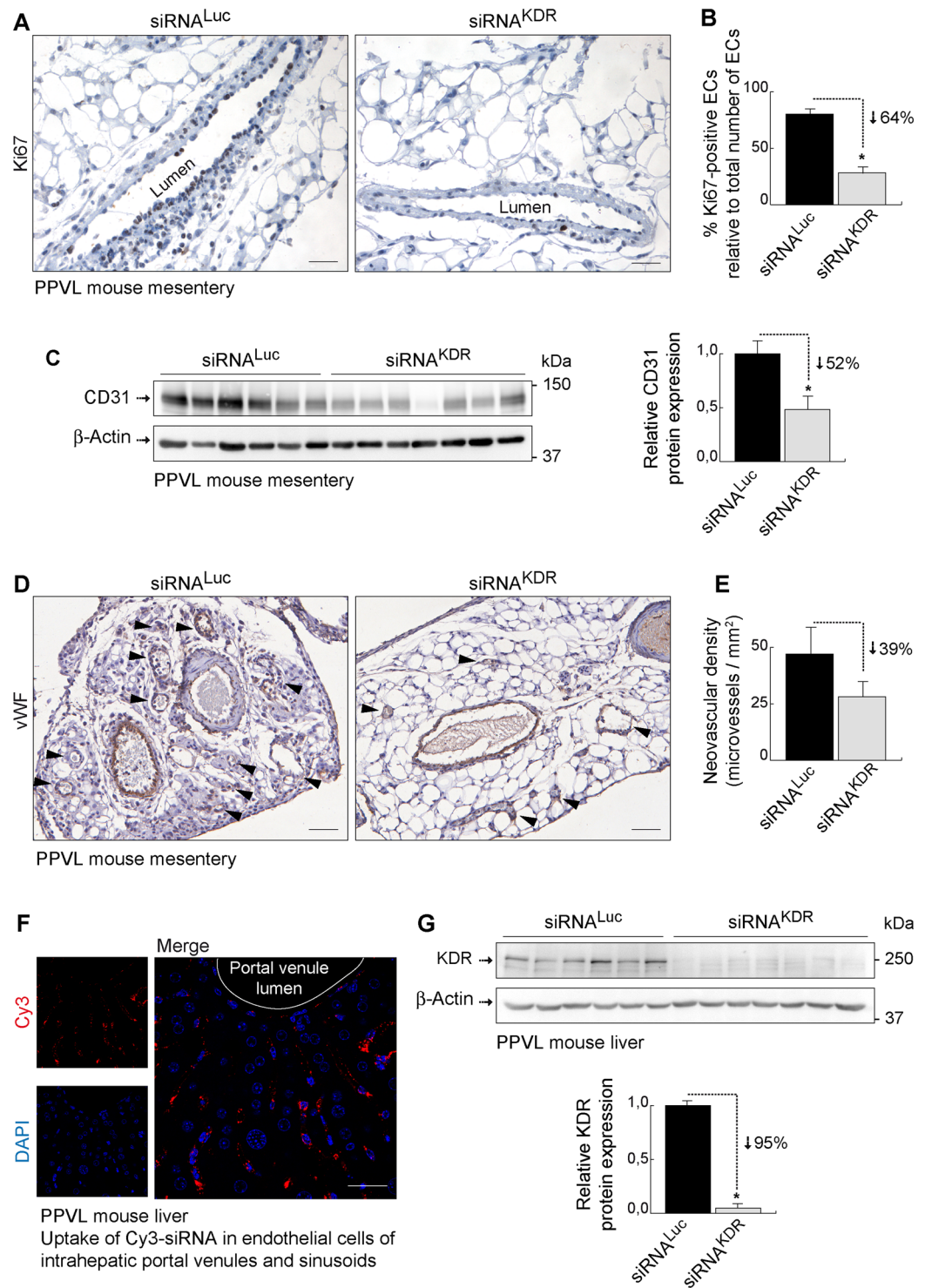


Figure 8. siKDR therapy limits pathological angiogenesis. **(A)** Representative Ki67 (cell proliferation marker) immunostaining in the mesentery of siRNA^{KDR}-lipoplex-treated and siRNA^{Luc}-lipoplex-treated portal hypertensive mice. Preexisting mesenteric microvenules with actively dividing endothelial cells were observed in siRNA^{Luc}-lipoplex-treated portal hypertensive mice. Treatment with siRNA^{KDR}-lipoplexes markedly reduced endothelial cell proliferation. Scale bars: 25 μ m. **(B)** Graph showing the percentage of total vascular endothelial cells that are positive for the cell proliferation marker Ki67 in each experimental group (%; mean \pm SEM). Mitotically quiescent endothelial cells were easily recognized by the lack of Ki67 immunoreactivity, the counterstaining with hematoxylin (which stains the cell nuclei in blue) post-immunohistochemistry, and their location as a single cell layer lining the interior surface of the blood vessels. *P* value: **p* < 0.05. **(C)** Representative immunoblotting showing decreased protein expression of the endothelial cell marker and angiogenesis index CD31 in the mesentery from siRNA^{KDR}-lipoplex-treated portal hypertensive mice, in comparison with siRNA^{Luc}-lipoplex-treated portal hypertensive animals. β -Actin served as loading control.

Densitometric quantification of protein expression (mean \pm SEM) is also shown. *P* value: $*p = 0.0022$. Whole blots are shown in Supplementary Fig. S5C. (D) Representative von Willebrand factor (vWF; endothelial cell marker) immunostaining in the mesentery of siRNA^{KDR}-lipoplex-treated and siRNA^{Luc}-lipoplex-treated portal hypertensive mice. Arrowheads indicate neovessels, which readily distinguished from preexisting vessels by their notoriously smaller caliber and thinner vascular wall. Scale bars: 50 μ m. (E) Quantification of vascular density (vWF-positive vessels/mm²; mean \pm SEM) of neovessels in mouse mesentery. (F) High resolution confocal microscopy showing the intracellular localization of fluorescently-labeled siRNA-Cy3-lipoplexes (red) in the endothelium of intrahepatic sinusoids and portal venules in portal hypertensive mice. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars: 50 μ m. (G) Representative immunoblotting demonstrating effective reduction of KDR protein expression, by 95%, in the liver of siRNA^{KDR}-lipoplex-treated portal hypertensive mice in comparison with siRNA^{Luc}-lipoplex-treated portal hypertensive animals. β -Actin served as loading control. Densitometric quantification of protein expression (mean \pm SEM) is also shown. *P* value: $*p < 0.0001$. Whole blots are shown in Supplementary Fig. S5D.

evaluated by histomorphometric analysis of mesenteric sections immunostained for the vessel specific marker, von Willebrand factor (vWF)⁴³. However, although many siRNA^{KDR}-lipoplex-treated mice had lower density of microvessels than animals receiving siRNA^{Luc}-lipoplex, averaged microvascular density was not significantly different between both treatment groups ($p = 0.3$), within the experimental parameters of the present study. A possible explanation comes from our recent findings⁵⁰. According to them, the abnormal neovascularization of the mesentery in portal hypertension arises through combination and proper coordination of both angiogenesis (endothelial cell-dependent and therefore targeted by siRNA^{KDR}-lipoplexes) and vasculogenesis (dependent on vascular wall-resident stem progenitor cells and therefore not directly targeted by the therapy used in this study)⁵⁰.

Treatment with siRNA^{KDR}-lipoplexes did not significantly modify spleen size (spleen weight and length per body weight ratio) (Fig. 6F), which is an indirect surrogate marker of portal pressure⁴⁰, indicating that inhibition of collateralization by siRNA^{KDR}-lipoplex administration occurred independently of the increased portal venous pressure, in agreement with our previous findings^{7,8}.

In this study, we focused our attention on the effects of a siRNA^{KDR}-lipoplex therapy on the portosystemic collateral circulation in portal hypertension, and selected the partial portal vein ligated model as an ideal animal model to study this specific disturbance. This is a model of prehepatic portal hypertension that develops a large percentage of portosystemic shunting, but not the typical abnormalities of the intrahepatic microcirculation in cirrhosis. But here we wanted to determine at least the potentiality of the siRNA^{KDR}-lipoplexes to target the liver. Indeed, we found that siRNA-lipoplexes were avidly and effectively uptaken by intrahepatic endothelial cells (both endothelial cells of portal venules in portal tracts and sinusoidal endothelial cells) (Fig. 8F), and were able to silence KDR expression ($p < 0.001$) (Fig. 8G; full blots are shown in Supplementary Fig. S5D), without significantly affecting liver function, as described above (Fig. 6B–D).

Discussion

In the present study, we have developed an innovative siRNA delivery system based on clinical stage components (i.e., siRNA^{KDR}-lipoplexes), capable to efficiently and specifically target KDR in vascular endothelial cells *in vivo* by systemic intravenous administration. Our results demonstrate that therapy with siRNA^{KDR}-lipoplexes is a highly promising approach to control and minimize the formation of portosystemic collateral vessels in portal hypertension. Thus, portosystemic circulation was highly vulnerable and susceptible to a treatment with siRNA^{KDR}-lipoplexes, initiated early in the course of the disease⁷, leading to a dramatic prevention of collateral extent and impairment of the angiogenic potential of endothelial cells in a murine model of portal hypertension. We also found that the mechanisms underlying the effects of KDR knockdown include reduced endothelial cell proliferation and decreased angiogenesis and vascular remodeling.

These findings are of particular significance since, although much has been learned about the pathophysiology of portosystemic collateral growth and the role that angiogenesis and KDR plays on it^{7–10}, this scientific knowledge has not yet been translated into clinical application. As a consequence, the development of portosystemic collaterals and gastroesophageal varices still remains one of the most clinically devastating consequences of portal hypertension and chronic liver disease^{1–5}. Importantly, targeting KDR with siRNA^{KDR}-lipoplexes could be a promising and plausible therapeutic modality for attenuating the formation of portosystemic collateral vessels in a clinical setting. Of note, this therapeutic intervention may potentially prevent the formation of large varices from small varices. This is important because new collaterals and varices develop each year during the evolution of chronic liver disease, and, currently, no treatment can prevent this development. Of interest, a related type of formulation has been shown to be viable and well tolerated for systemic administration of siRNAs and it is currently being evaluated in clinical trials for treatment of patients with advanced solid tumors, further supporting the translational relevance and therapeutic potential of this approach for portal hypertension and chronic liver disease in a clinical context.

The aim of targeting KDR in vascular endothelial cells in this study was based on three major observations: i) the well-established central role of endothelial KDR in pathological angiogenesis^{16–20}, ii) prior work linking KDR to portosystemic collateralization in portal hypertension^{7–10}, and iii) the ease by which endothelial cells can be targeted by siRNAs due to their unique position in the vessel and direct accessibility for systemically administered siRNA-loaded particles. In fact, our siRNA^{KDR}-lipoplexes were designed to allow systemic delivery specifically to vascular endothelial cells^{27–32}. This is favorable by reducing both the amounts of siRNA needed for therapeutic benefit as well as the likelihood of off-target effects caused by KDR knockdown in other cell types. Notably, we achieved an efficient functional intracellular siRNA^{KDR} delivery after intravenous administration in portal hypertensive mice,

being the siRNA-lipoplexes avidly taken up by the angiogenic microvasculature. Interestingly, the delivery efficiency was higher in the activated endothelium of mesenteric microvenules of portal hypertensive mice than in microarterioles. This is relevant because sprouting angiogenesis typically originates from the venous side of the vascular bed^{16,17}, and our previous studies demonstrate that the majority of changes associated with mesenteric neovascularization in portal hypertension affect the microvenules and, to a lesser degree, the microarterioles^{34,48}. It must be noted that endothelial cells in portal hypertensive mesenteric microvenules have an activated phenotype characterized by overexpression of KDR, expression of cell proliferation markers (Ki67) and a rounded morphology with prominent nucleus (Figs 4 and 5B)^{34,49}. In addition, structural and functional differences among arterioles and venules are reflected by unique transcriptional signatures within microvascular endothelial cells lining these vessels⁵¹. It is therefore likely that this portal hypertension-activated angiogenic microvenular endothelium was especially predisposed to uptake siRNA-lipoplexes, which is essential in order to achieve therapeutic effects.

Consequently, our delivery strategy allowed us to achieve substantial reduction of the pathologically relevant KDR overexpression in portal hypertensive mice, of a sufficient magnitude to induce therapeutic effects, but not a complete disappearance of KDR indicating that some functional RNA or protein remains and is translated at lower levels. This is beneficial for molecular targets such as KDR, which are crucial for vascular homeostasis^{16–20}. Furthermore, the use of siRNA^{KDR} would also allow selective KDR inhibition without affecting even closely related proteins compared with the relative promiscuity of small-molecule inhibitors and multikinase inhibitors^{8–10}. Worthy of note is that the RNA interference pathway, used by siRNA molecules to selectively limit the expression of targeted mRNAs, naturally occurs in the organism^{24–26}.

Another interesting aspect is that KDR is not only a master controller of angiogenic events such as endothelial cell proliferation, sprouting and branching^{16–20}, but is also an active player in modulation of vasomotor collateral dynamics and vascular remodeling^{42–45}, which are additional important driving forces for collateral growth in portal hypertension^{5,42,43}. In fact, KDR can promote remodeling independently of its VEGF-binding capability, by acting directly as a mechanoreceptor sensitive to changes in blood flow and shear stress^{42–45}. Accordingly, targeting KDR would offer the added value of suppressing portosystemic collateralization on several levels, such as angiogenesis and flow-induced collateral remodeling, as suggested by the striking magnitude of reduction in portosystemic collateralization and collateral blood flow, as well as the downregulation of the expression of vascular remodeling markers produced by the siRNA^{KDR}-lipoplex therapy in portal hypertensive mice.

In summary, our preclinical studies with siRNA^{KDR}-lipoplex in a mouse model demonstrate a therapeutic benefit in preventing the development of portosystemic collateral vessels in portal hypertension. Overall, we believe that our study represents an important new step towards the application of siRNAs as therapeutic agents in portal hypertension and chronic liver disease. Given the emerging roles of angiogenesis in a number of human pathologies, including inflammation, obesity and tumor growth, siRNA^{KDR}-lipoplexes may provide a novel strategy to treat a wide spectrum of diseases.

References

1. Sanyal, A. J., Bosch, J., Blei, A. & Arroyo, V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology*. **134**, 1715–1728 (2008).
2. Schuppan, D. & Afdhal, N. H. Liver cirrhosis. *Lancet*. **371**, 838–851 (2008).
3. Garcia-Tsao, G. & Bosch, J. Management of varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *N Engl J Med*. **362**, 823–832 (2010).
4. Sharara, A. I. & Rockey, D. C. Gastroesophageal variceal hemorrhage. *N Engl J Med*. **345**, 669–681 (2001).
5. Fernandez, M. & Abraldes, J. G. Gastroesophageal varices. In: *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants* (ed. Muriel, P.) 451–473 (Academic Press, Elsevier, 2017).
6. Moreau, R. VEGF induced angiogenesis drives collateral circulation in portal hypertension. *J Hepatol*. **43**, 6–8 (2005).
7. Fernandez, M., Vizzutti, F., Garcia-Pagan, J. C., Rodes, J. & Bosch, J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology*. **126**, 886–894 (2004).
8. Fernandez, M. *et al.* Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol*. **43**, 98–103 (2005).
9. Fernandez, M. *et al.* Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology*. **46**, 1208–1217 (2007).
10. Mejias, M. *et al.* Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology*. **49**, 1245–1256 (2009).
11. Geerts, A. M. *et al.* Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an *in vivo* study. *Liver Int*. **26**, 889–898 (2006).
12. Reiberger, T. *et al.* Sorafenib attenuates the portal hypertensive syndrome in partial portal vein ligated rats. *J Hepatol*. **51**, 865–873 (2009).
13. Schwabl, P. *et al.* Pioglitazone decreases portosystemic shunting by modulating inflammation and angiogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertensive rats. *J Hepatol*. **60**, 1135–1142 (2014).
14. Huang, H. C. *et al.* Cannabinoid receptor 2 agonist ameliorates mesenteric angiogenesis and portosystemic collaterals in cirrhotic rats. *Hepatology*. **56**, 248–258 (2012).
15. Hsu, S. J. *et al.* Endothelin receptor blockers reduce shunting and angiogenesis in cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest*. **46**, 572–580 (2016).
16. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. **9**, 653–660 (2003).
17. Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. **146**, 873–887 (2011).
18. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. **9**, 669–676 (2003).
19. Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signaling. In control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **7**, 359–371 (2006).
20. Simons, M., Gordon, E. & Claesson-Welsh, L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **17**, 611–625 (2016).
21. Shah, V. H. & Bruix, J. Antiangiogenic therapy: not just for cancer anymore? *Hepatology*. **49**, 1066–1068 (2009).
22. Fernandez, M. *et al.* Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol*. **50**, 604–620 (2009).
23. Fernandez, M. Molecular pathophysiology of portal hypertension. *Hepatology*. **61**, 1406–1415 (2015).
24. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **391**, 806–811 (1998).
25. Elbashir, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. **411**, 494–498 (2001).

26. Davis, M. E. *et al.* Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*. **464**, 1067–1070 (2010).
27. Santel, A. *et al.* A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther.* **13**, 1222–1234 (2006).
28. Aleku, M. *et al.* Intracellular localization of lipoplexed siRNA in vascular endothelial cells of different mouse tissues. *Microvasc Res.* **76**, 31–41 (2008).
29. Santel, A. *et al.* RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene Ther.* **13**, 1360–1370 (2006).
30. Santel, A. *et al.* Atu027 prevents pulmonary metastasis in experimental and spontaneous mouse metastasis models. *Clin Cancer Res.* **16**, 5469–5480 (2010).
31. Aleku, M. *et al.* Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression. *Cancer Res.* **68**, 9788–9798 (2008).
32. Landen, C. *et al.* Intraperitoneal delivery of liposomal siRNA for therapy of advanced ovarian cancer. *Cancer Biol Ther.* **5**, 1708–1713 (2006).
33. Williams, R. L. *et al.* Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment. *Cell*. **57**, 1053–1063 (1989).
34. Calderone, V. *et al.* Sequential functions of CPEB1 and CPEB4 regulate pathologic expression of VEGF and angiogenesis in chronic liver disease. *Gastroenterology*. **150**, 982–997 (2016).
35. Zhang, L. *et al.* Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res.* **63**, 3403–3412 (2003).
36. Fehring, V. *et al.* Delivery of therapeutic siRNA to the lung endothelium via novel lipoplex formulation DACC. *Mol Ther.* **22**, 811–820 (2014).
37. Fernandez, M. *et al.* Effects of ritanserin, a selective and specific 5-HT₂-serotonergic antagonist, on portal pressure and splanchnic hemodynamics in rats with long-term bile duct ligation. *Hepatology*. **18**, 389–393 (1993).
38. Sarabipour, S., Ballmer-Hofer, K. & Hristova, K. VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *Elife*. **5**, e13876, <https://doi.org/10.7554/eLife.13876> (2016).
39. Newman, P. J. *et al.* PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. **247**, 1219–1222 (1990).
40. Mejias, M. *et al.* Relevance of the mTOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension. *J Hepatol.* **52**, 529–539 (2010).
41. Fedorov, Y. *et al.* Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*. **12**, 1188–1196 (2006).
42. Langille, B. L. & O'Donnell, F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science*. **231**, 405–407 (1986).
43. Chen, K. D. *et al.* Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem.* **274**, 18393–18400 (1999).
44. Jin, Z. G. *et al.* Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* **93**, 354–363 (2003).
45. Tzima, E. *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*. **437**, 426–431 (2005).
46. Libby, P., Warner, S. J., Salomon, R. N. & Birinyi, L. K. Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth-muscle cells from human atheroma. *N Engl J Med.* **318**, 1493–1498 (1988).
47. Botney, M. D., Bahadori, L. & Gold, L. I. Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta. *Am J Pathol.* **144**, 286–295 (1994).
48. Mazar, R. *et al.* Matrix metalloproteinase-1-mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor-2 in endothelial cells. *J Biol Chem.* **288**, 598–607 (2013).
49. Gerlach, C., Golding, M., Larue, L., Alison, M. R. & Gerdes, J. Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab Invest.* **77**, 697–698 (1997).
50. Garcia-Pras, E. *et al.* Role and therapeutic potential of vascular stem/progenitor cells in pathological neovascularisation during chronic portal hypertension. *Gut*. **66**, 1306–1320 (2017).
51. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* **100**, 158–173 (2007).

Acknowledgements

This work was supported by grants to M.F. from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO; SAF2014-55473-R), the European Union FEDER funds, the Scientific Foundation of the Spanish Association Against Cancer (AECC), and the Worldwide Cancer Research Foundation.

Author Contributions

J.G. and E.G.P.: performed the experiments. M.M. and N.P.: contributed to *in vivo* studies. U.S.: contributed to *in vitro* studies. M.F.: conceived and directed the study, prepared figures, wrote the paper and provided funding.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14818-7>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Therapeutic siRNA targeting endothelial KDR decreases portosystemic collateralization in portal hypertension

Javier Gallego, Ester Garcia-Pras, Marc Mejias, Nuria Pell , Ute Schaeper,
Mercedes Fernandez

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Fig.S1: Full blots corresponding to western blottings in Main

Figure 1: **(A)** Full blots for KDR and its loading control p110 α in HUVEC cells, corresponding to western blotting in Figure 1A. **(B)** Full blots for KDR and its loading control p110 α in HUVEC cells, corresponding to western blotting in Figure 1B (top). **(C)** Full blots for KDR and its loading control p110 α in HUVEC cells, corresponding to western blotting in Figure 1B (bottom).

Supplementary Fig.S2: Full blots corresponding to western blottings in Main

Figures 3, 5 and 6: **(A)** Full blots for KDR and its loading control β -actin in H5V cells, corresponding to western blotting in Figure 3B. **(B)** Full blots for KDR and its loading control GAPDH in mouse mesentery, corresponding to western blotting in Figure 5A. **(C)** Full blots for KDR and its loading control β -actin in PPVL mouse mesentery, corresponding to western blotting in Figure 5D. **(D)** Full blots for TNF α and its loading control GAPDH in PPVL mouse liver, corresponding to western blotting in Figure 6C.

Supplementary Fig.S3: Negative controls for immunofluorescence:

(A) Representative confocal microscopy micrographs of the mesentery from portal hypertensive mice (at day 5 after partial portal vein ligation, PPVL). These mice were not injected with siRNA-Cy3-lipoplexes, and were used as tissue autofluorescence negative controls to test whether the light emissions observed in the mesenteries injected with labeled siRNA were due to autofluorescence produced by the tissue. **(B)** In negative controls for double immunofluorescence

stainings, mice were not injected with siRNA-Cy3-lipoplexes and the anti-CD31 primary antibody was omitted. In both cases, not detectable fluorescence was found in these tissues, except for the autofluorescent erythrocytes in the vessel lumen. Scale bars: 50 μ m.

Supplementary Fig.S4: Histology of mouse mesentery: Representative micrograph of mesenteric sections stained with H&E from portal hypertensive mice, illustrating preexisting vessels (preexisting venule and preexisting arteriole) and also neovessels (arrowheads), which are evident already at day 3 after inducing portal hypertension by partial portal vein ligation (PPVL). Image also shows adipocytes, which are the largest component of loose connective tissue of the mesentery. Note that adipocytes appear empty as lipids are extracted during specimen preparation. Scale bar: 50 μ m.

Supplementary Fig.S5: Whole blots corresponding to western blottings in Main Figures 7 and 8: **(A)** Full blots for TGF β and its loading control GAPDH in PPVL mouse portal vein, corresponding to western blotting in Figure 7C. **(B)** Full blots for PDGF-B and its loading control GAPDH in PPVL mouse portal vein, corresponding to western blotting in Figure 7D. **(C)** Full blots for CD31 and its loading control β -actin in PPVL mouse mesentery, corresponding to western blotting in Figure 8C. **(D)** Full blots for KDR and its loading control β -actin in PPVL mouse liver, corresponding to western blotting in Figure 8G.

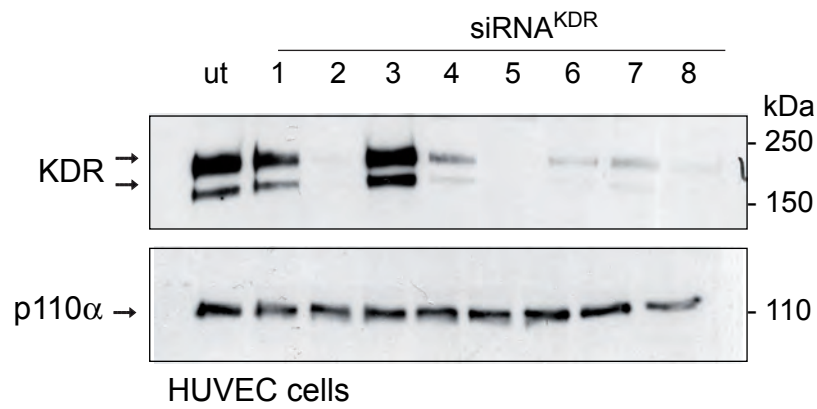
SUPPLEMENTARY METHODS

RNA isolation and real-time reverse transcriptase (RT)-PCR analysis. Total RNA was extracted and purified from mouse H5V cells using the RNAeasy Mini Kit (Qiagen), in accordance with the manufacturer's instructions. The amount of RNA was measured by NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Then, 1 μ g of total RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany), which includes all the components required for effective elimination of genomic DNA contamination in RNA samples and for accurate real-time PCR. The synthesized cDNA was then amplified by real time PCR using KDR (Mm01222421_m1) and GAPDH (Mm99999915_g1) TaqMan Gene expression assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), in an ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Each sample was run in duplicate using nuclease-free water as control. Expression levels of KDR gene were normalized to endogenous control GAPDH, which was unaffected in the different treatment groups.

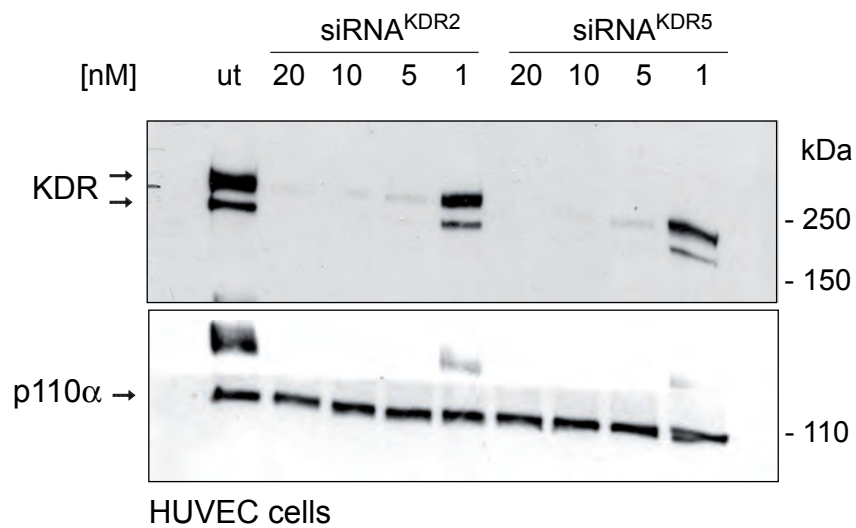
Immunoblotting. Mouse tissues were excised, immediately snap-frozen in liquid nitrogen and pulverized in a ceramic mortar surrounded by dry ice. Aliquots of the powder were then homogenized in ice-cold lysis buffer containing 20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL pepstatin, 40 μ g/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ M sodium pyrophosphate, 20 μ M sodium fluoride, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, and 0.1 μ M okadaic acid. The resultant lysates were centrifuged, the supernatants were

collected, and total protein concentration was measured using the Bradford Protein assay (BioRad; Hercules, CA). Equal amounts of total protein (25 μ g) were heated (5 min at 95°C) in sample buffer containing sodium dodecyl sulfate (SDS) and β -mercaptoethanol, and separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After transfer onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, specific proteins were incubated, at 4°C overnight, with monoclonal primary antibodies against KDR (1:200 dilution; sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and PDGF-B (1:500 dilution; sc-365805, Santa Cruz) and polyclonal primary antibodies against TNF α (1:1000 dilution; ab66579, Abcam), CD31 (1:200 dilution; sc-1506R, Santa Cruz) and TGF β (1:500 dilution; ab66043, Abcam). Blots were subsequently washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:10,000 dilution): anti-rabbit IgG (ENZO, Farmingdale, NY) and anti-mouse IgG (Sigma, Saint Louis, MO). Immunoreactive bands were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (Immobilon Western; Millipore, Billerica, MA). Loading accuracy was evaluated by Ponceau S staining and by membrane rehybridization with mouse monoclonal antibodies against β -actin (1:1,000 dilution; A2228, Sigma) or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:1,000 dilution; sc-32233, Santa Cruz). Quantification of protein signals was performed using computer-assisted densitometry. For immunoblotting in cells, cells were collected by trypsinization and lysed with the ice-cold lysis buffer described above. After a strong vortex, lysates were centrifuged (10 min, at 4°C and maximum speed) and supernatants were collected, quantified, and desnaturalized. Equal amounts of proteins were immunoblotted as described above. Antibodies against human KDR used in HUVECs were from Cell Signaling (#2479; Danvers, MA).

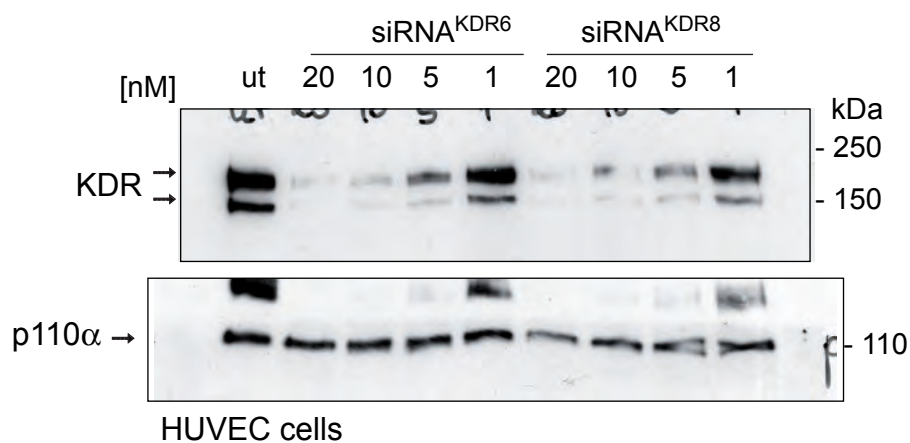
A Full blots corresponding to Figure 1A



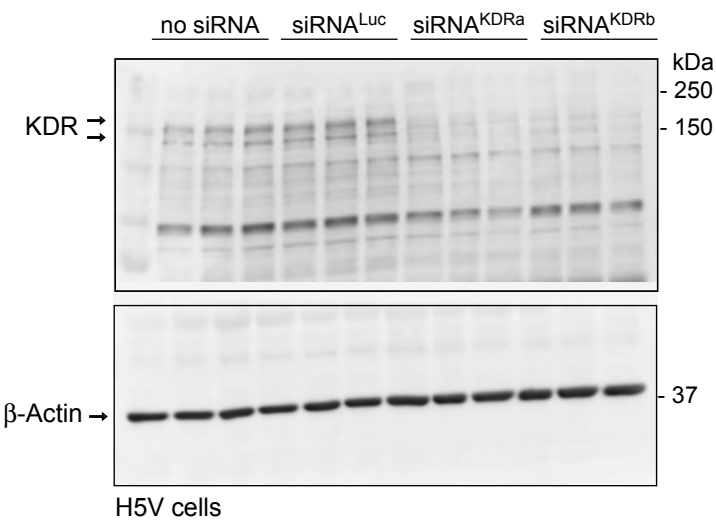
B Full blots corresponding to Figure 1B (top)



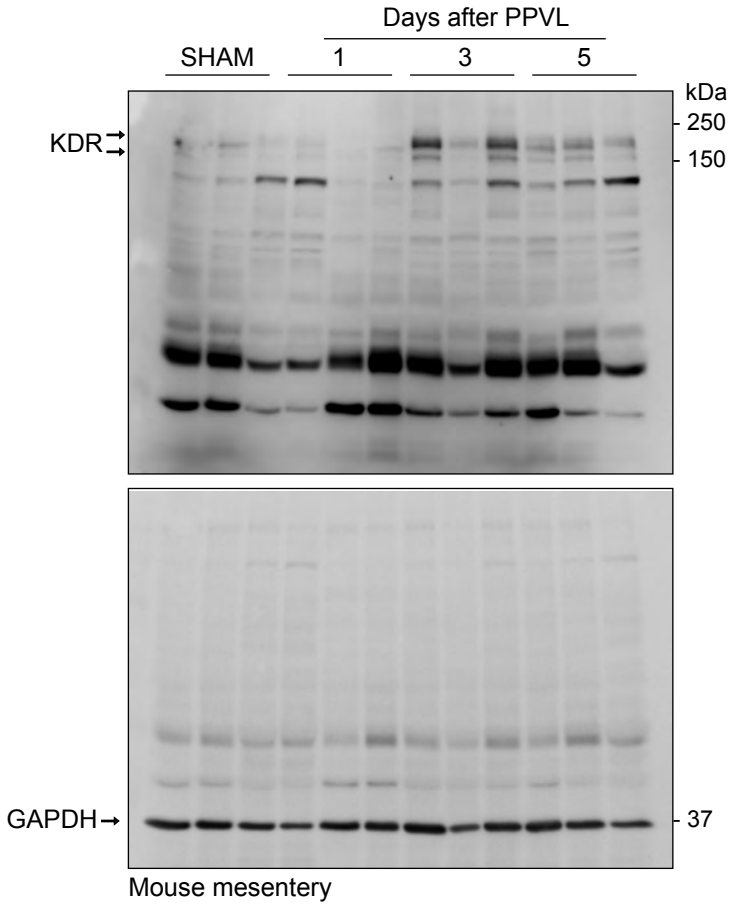
C Full blots corresponding to Figure 1B (bottom)



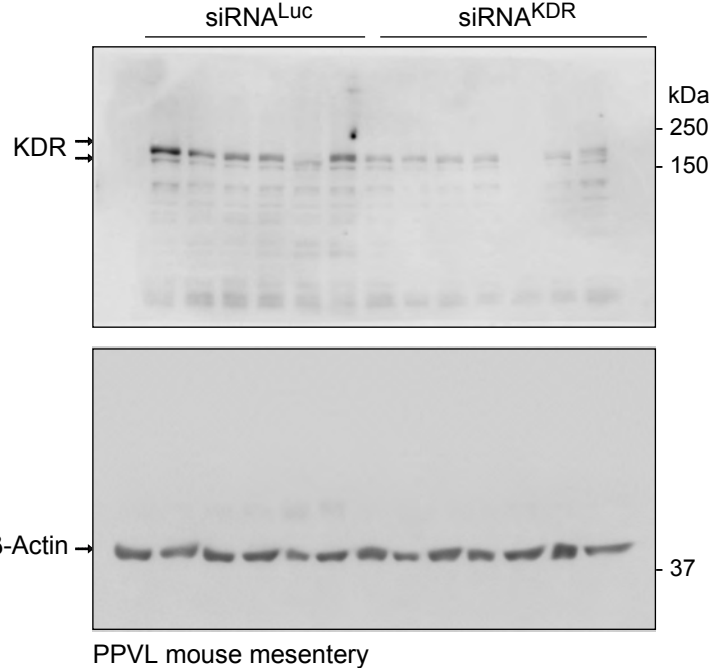
A Full blots corresponding to Figure 3B



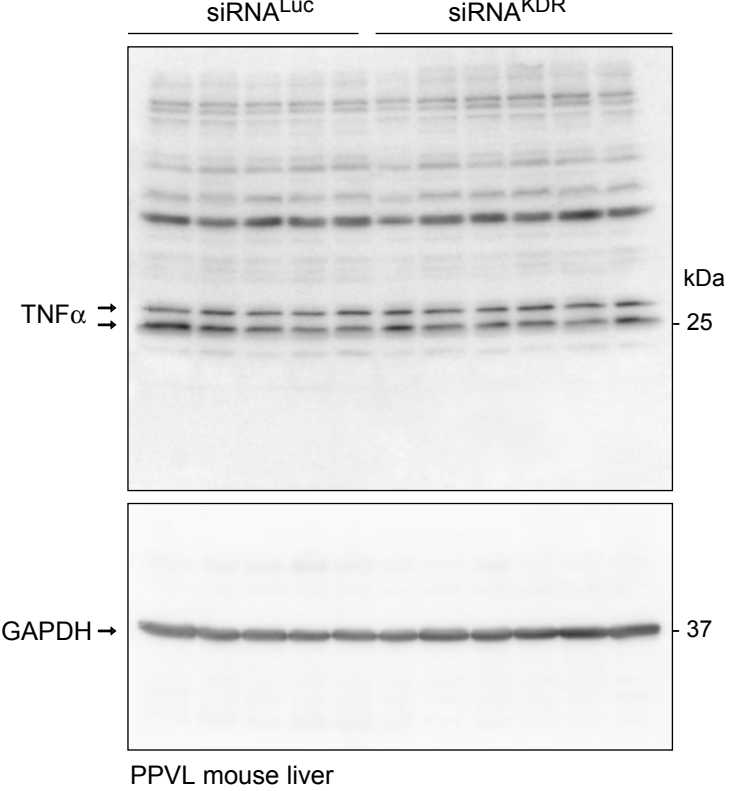
B Full blots corresponding to Figure 5A



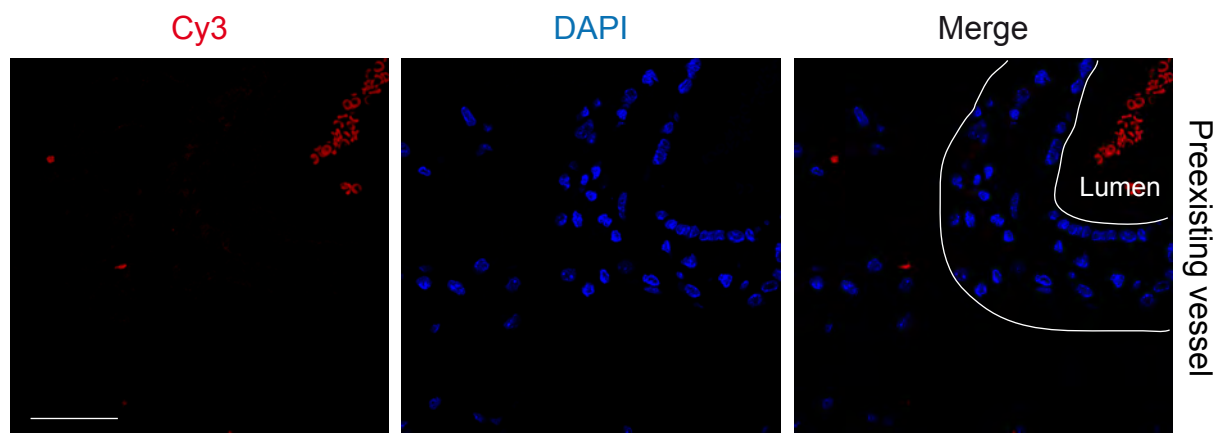
C Full blots corresponding to Figure 5D



D Full blots corresponding to Figure 6C



A



PPVL mouse mesentery

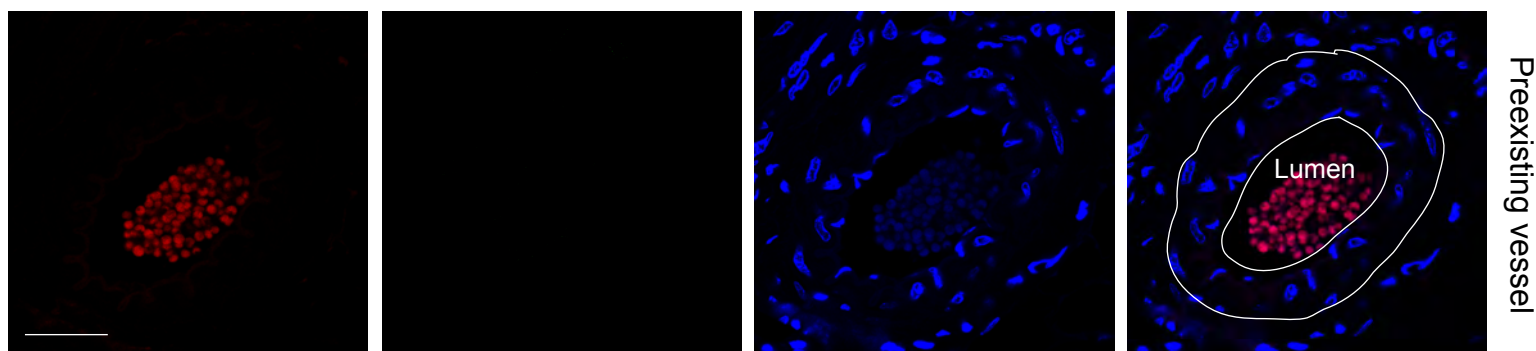
B

Cy3

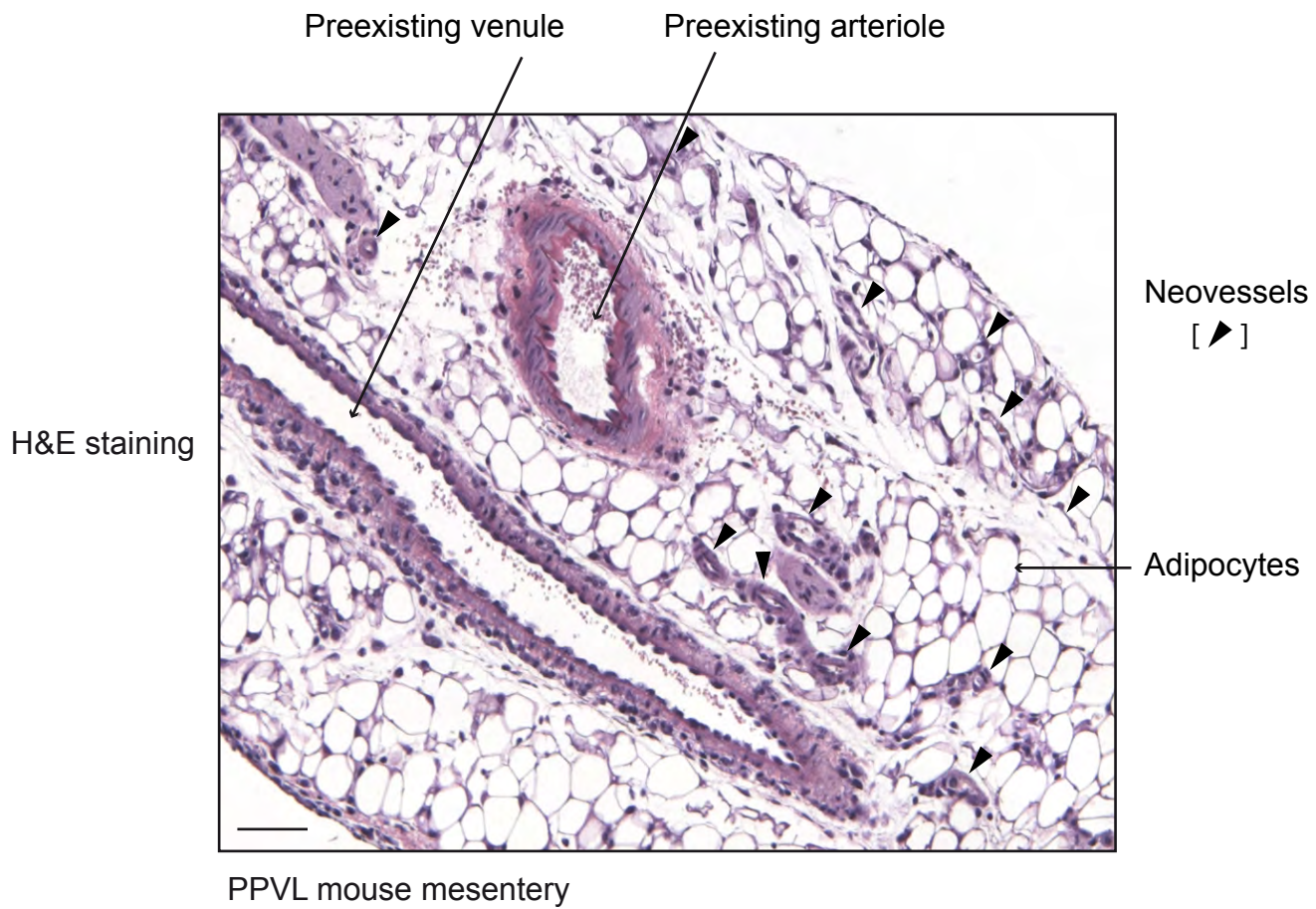
CD31

DAPI

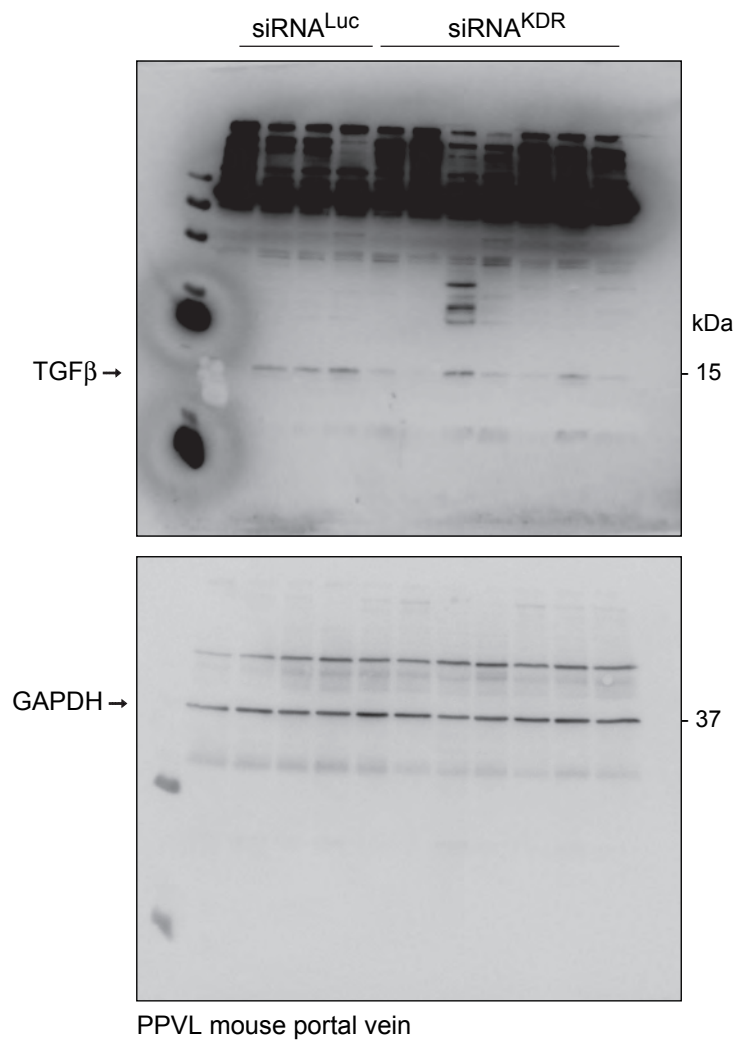
Merge



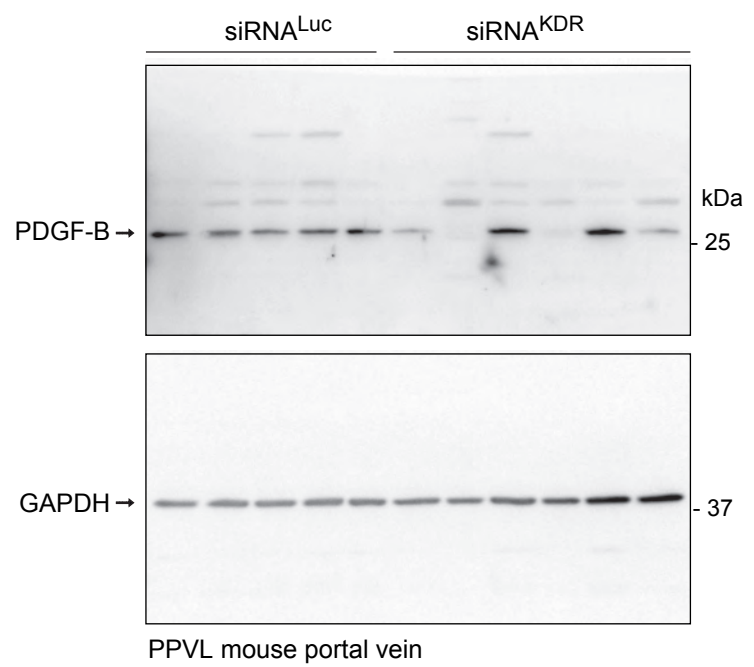
PPVL mouse mesentery



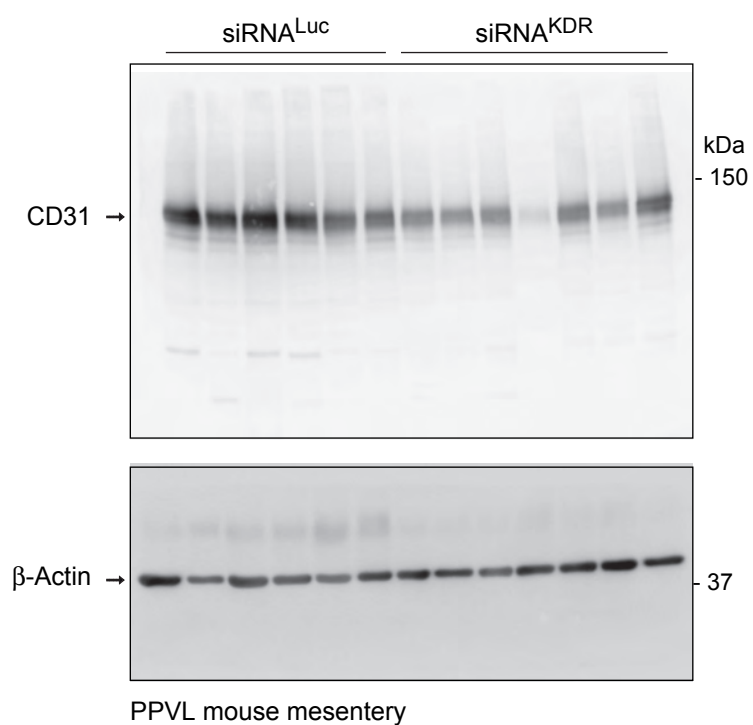
A Full blots corresponding to Figure 7C



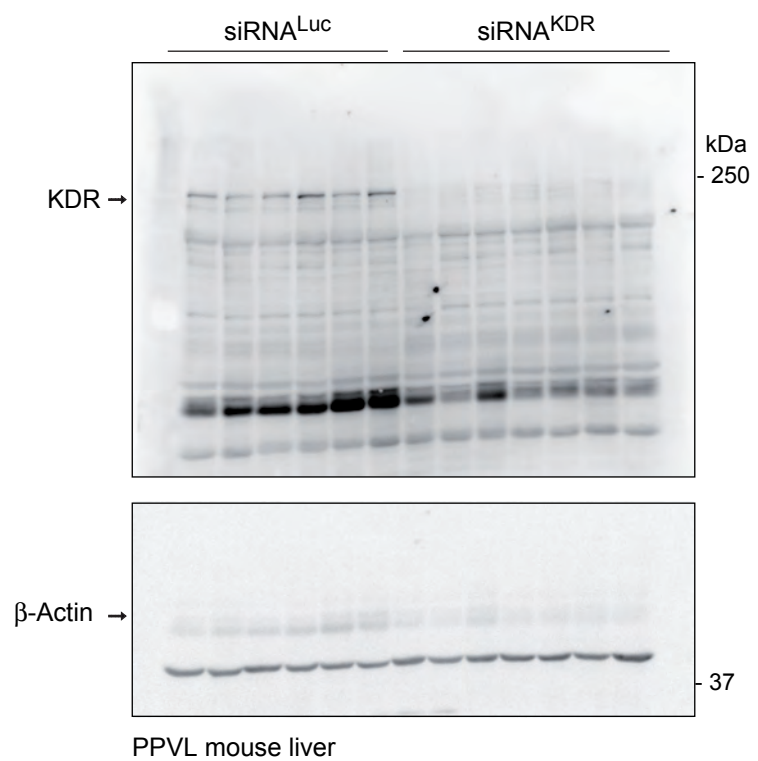
B Full blots corresponding to Figure 7D



C Full blots corresponding to Figure 8C



D Full blots corresponding to Figure 8G



Discussió

5. Discussió

La fisiopatologia de la hipertensió portal ha estat motiu de molta recerca en els darrers anys i ha generat treballs de gran rellevància per a l'avenç en la comprensió dels paradigmes d'aquesta síndrome. La distorsió de l'arquitectura hepàtica, amb fenòmens de fibrosi, inflamació i angiogènesi continua essent un tema molt estudiat, així com tots els mecanismes implicats en la modificació del to vascular, també molt important per al desenvolupament de la malaltia. El que passa a nivell extrahepàtic no és menys interessant. De fet, és molt complex. L'augment de flux sanguini esplàncnic, parcialment degut a una vasodilatació arteriolar mesentèrica i a una disminuïda resposta a vasoconstrictors endògens, perpetua i exacerba aquest increment de la pressió portal. Les complicacions que això comporta no són menors: peritonitis bacteriana espontània i ascites, formació de vasos portocol·laterals com les varius gastroesofàgiques, encefalopatia i sèpsia^{1,24}. Per aquest motiu, la majoria de tractaments existents a l'actualitat per a la hipertensió portal van dirigits a disminuir el flux esplàncnic augmentat mitjançant vasoconstrictors.

La descoberta que la neovascularització patològica juga un clar paper en la fisiopatologia de la hipertensió portal ha marcat un abans i un després en la recerca d'aquest camp i s'ha convertit en un segell característic d'aquesta síndrome. És un fet demostrat que en situacions de cirrosi i/o hipertensió portal, el territori esplàncnic experimenta fenòmens d'angiogènesi activa que contribueixen a la formació de nous vasos, anomenats col·laterals i que són un determinant de gran importància en el desenvolupament de la malaltia i en les seves conseqüències. L'ús d'inhibidors d'aquesta angiogènesi, com a eina terapèutica, ha estat motiu de molts i variats treballs, ja que s'especula que pot oferir un gran benefici al pacient, atenuant la hipertensió a la vena porta, disminuint la hiperèmia esplàncnica i la col·lateralització portosistèmica i inclús reduint la fibrosi hepàtica³⁸.

Com en qualsevol camp, la recerca bàsica és la que aporta el coneixement necessari per avançar; fins a data d'avui s'han descrit (en part) els fenòmens implicats en aquesta neovascularització i s'han començat a desxifrar vies, mecanismes i molècules implicades. Però la complexitat dels processos és evident i la regulació dels factors que hi participen es fa tan necessària d'estudiar com a vegades inaccessible.

L'angiogènesi és un fenomen que es refereix exclusivament a la formació de nous vasos a partir de la proliferació i migració de cèl·lules endotelials madures i del propi vas. Es tracta d'un procés fisiològic normal que es dona durant el desenvolupament embrionari, el creixement de l'organisme o la cicatrització de ferides⁹⁶. No és estrany pensar, doncs, que sigui un procés altament regulat; s'han descrit i estudiat nombroses vies, mecanismes i molècules que modulen la formació dels nous vasos i cada dia apareixen nous estudis que aporten més coneixement a l'àrea. Per exemple, un estudi recent ha demostrat que existeixen mecanismes alternatius reguladors de la traducció de la proteïna VEGF, un factor de gran importància en l'angiogènesi en general i en la que trobem en la hipertensió portal en particular. Concretament l'estudi demostra que en fases primerenques d'hipertensió portal, s'activa la traducció dels ARN missatgers de VEGF elevant els nivells d'aquesta proteïna i promovent fenòmens d'angiogènesi patològica. Tanmateix és un mecanisme de regulació tan fi que la depleció de la proteïna que regula aquesta traducció (CPEB) no afecta als nivells basals de VEGF ni per tant al manteniment de la vasculatura normal⁸². Però una angiogènesi anormal o excessiva pot conduir a desordres importants o inclús malalties, com la progressió/malignitat dels tumors, psoriasis, artritis, ceguesa o obesitat.

Donada doncs, la importància d'aquest fenomen és normal que estigui molt estudiat i reportat. La vasculogènesi, que es refereix a la formació de nous vasos a partir de cèl·lules endotelials progenitores, és un fenomen que es creia reservat a la vida embrionària però fa uns quants anys s'ha vist que també ocorre en l'organisme adult. El camp d'estudi de les cèl·lules mare ha estat explorat extensament les últimes dècades i ha generat molts treballs, sovint també contradictoris. Però el concepte, relativament recent,

que hi ha cèl·lules mare residents en els teixits adults ha revolucionat els paradigmes de la fisiologia i la patologia, cosa que ha impulsat nous i interessants estudis.

En el terreny vascular, s'ha descrit àmpliament la presència de cèl·lules progenitores procedents del moll de l'os, circulants, així com la seva contribució directa o indirecta a processos de neovascularització en diversos teixits i òrgans i en diferents contextos. Però pel que fa a l'existència de nínxols de cèl·lules mare residents en els vasos sanguinis podríem dir que tot just comencen a publicar-se estudis que els identifiquen i els descriuen.

La finalitat del **primer estudi** va ser precisament identificar i caracteritzar una hipotètica població de cèl·lules mare/progenitores en les parets vasculars dels vasos sanguinis del territori esplàncnic, concretament al mesenter i a la vena porta. L'aproximació *in vitro* ens va permetre aïllar de la fracció de l'estroma vascular del mesenter i la vena porta una població que exhibia dues característiques típiques de les cèl·lules mare: capacitat autoregeneradora, també coneguda com self-renewal, i capacitat de diferenciació. L'assaig de formació d'esferes o "clústers" en suspensió, àmpliament utilitzat per a identificar cèl·lules mare en diferents nínxols tissulars, va demostrar que els vasos sanguinis esplànctics i la vena porta contenen una subpoblació que, cultivada en suspensió, forma uns esfèroides producte de la seva capacitat de creixement clonal. En aquests tipus d'assajos, és important tenir en compte algunes especificacions tècniques com ara la densitat de sembra ja que l'objectiu de l'assaig és poder demostrar que cada una de les esferes deriva d'una única cèl·lula sembrada, i que té per tant un origen clonal. Els resultats conclouen que inclús a baixes densitats de sembra (0.33 cells/ μ l) només amb 4 dies de cultiu ja hi ha esferes en suspensió. A més, les cèl·lules derivades d'esferes primàries dissociades eren capaces de tornar a formar esfèroides en una segona generació en suspensió, demostrant aquesta sostinguda capacitat autoregeneradora de les cèl·lules mare.

Considerem important remarcar que els teixits van ser prèviament perfosos per eliminar qualsevol rastre de cèl·lula progenitora circulant que pogués emascarar el resultat final i poder assegurar així, que el mesenteri i la vena porta són reservori de cèl·lules mare/progenitores.

Havent provat l'existència d'aquestes cèl·lules, vam voler identificar-les i per això calia fer-ne una caracterització fenotípica. La detecció mitjançant immunohistoquímica de diferents marcadors que se solen associar a determinades poblacions progenitores ens va ajudar a identificar-les. Les esferes aïllades de mesenteri expressaven els marcadors clàssics de cèl·lula mare ckit i CD133 i també alguns de cèl·lula endotelial progenitora com Flk-1 o CD34, suggerint per tant que estaven compromesos almenys en la línia vascular.

Una altra característica típica de les cèl·lules mare és la seva capacitat de diferenciar-se. Si podíem provar que aquestes cèl·lules aïllades de mesenteri i de vena porta de rata podien diferenciar-se a un tipus cel·lular vascular madur, seria una prova més que en aquests teixits adults hi ha una població progenitora resident capaç de participar en una neovascularització. La capacitat vasculogènica d'aquestes cèl·lules va quedar provada *in vitro* quan es va realitzar l'assaig de tubulogènesi en matrigel i les cèl·lules provinents d'aquests esferoides van ser capaces d'organitzar-se, migrar i formar aquestes xarxes tubulars, típiques de les cèl·lules endotelials madures. Tanmateix, quan vam provar d'enganxar les esferes a un substrat, tot imitant una matriu, vam veure com aquestes cèl·lules adquirien una morfologia elongada i fusiforme i que començaven a expressar marcadors de cèl·lula de múscul llis com l'alfa-SMA. Davant aquesta possible bipotència, també vam valorar si davant un pretractament de les cèl·lules progenitores amb un factor que les comprometia a un determinat llinatge (per exemple amb PDGF) podien diferenciar-se a un tipus perícit, embolcallant una xarxa endotelial preformada en matrigel.

Tots els resultats obtinguts d'aquesta colla d'experiments demostren les propietats vasculogèniques d'aquesta població progenitora resident, que seria capaç de diferenciar-se a ambdós llinatges vasculars d'una manera dirigida i controlada.

La dificultat de trobar marcadors específics que identifiquin les poblacions progenitores i les emmarquin en els diferents llinatges fa que siguin tant útils com necessaris els assajos funcionals. Classificar les diferents poblacions només fent servir marcadors de superfície no és una metodologia gaire fiable avui en dia, ja que el mateix marcador pot ser compartit per diferents subpoblacions i també poblacions madures sense propietats progenitores. A més, també s'ha vist que l'expressió dels marcadors és dinàmica, depèn de l'estat o moment del cicle en el que es trobi la cèl·lula, així es podria arribar a classificar una mateixa població en dues diferents només per l'expressió en superfície de determinats marcadors. Seria l'exemple de CD133, normalment utilitzat com a marcador putatiu per a cèl·lules mare però que la seva expressió clarament varia segons si està en estat quiescent o activat⁹⁷.

És per això que davant la falta de clars marcadors de superfície i per l'absència d'un fenotip i morfologia distingible envers altres cèl·lules, són necessaris els criteris funcionals per a identificar i caracteritzar les poblacions progenitores⁹⁸.

Després d'haver aïllat i caracteritzat aquestes cèl·lules *in vitro*, calia demostrar l'existència d'aquesta població/poblacions *in situ*, hipotèticament a la paret dels vasos del mesenter i de la vena porta. Els teixits adults que es caracteritzen per un renovament cel·lular constant (turnover) contenen cèl·lules terminals i diferenciades que s'originen prèviament de cèl·lules progenitores amb alta capacitat proliferativa que a la vegada provenen d'una població de cèl·lules mare relativament petita que tanmateix estan en un estat quiescent si les comparem amb la seva progènie. Aquesta població petita, quiescent o dorment, constituïria un nínxol de cèl·lules mare, amb capacitat regeneradora en els diferents teixits o òrgans⁹⁹. Per veure si tenim un nínxol de cèl·lules dorments en les parets dels vasos del territori esplàncnic fem servir un assaig que durant molts anys s'ha utilitzat per identificar cèl·lules somàtiques amb baixa taxa replicativa, també anomenades "slow-cycling cells". És un assaig funcional que es basa en administrar un anàleg de la timidina, la bromodeoxiuridina (BrdU) durant un període de temps per marcar així els nuclis de les cèl·lules en cicle, i després deixar un període més o menys llarg (chase) en absència

d'aquesta molècula. Les cèl·lules que es divideixen ràpidament dilueixen el marcatge ja que transfereixen la BrdU a les cèl·lules filles, però les cèl·lules quiescents, dorments, retenen aquesta molècula i poden ser rastrejades en el temps. Un exemple clar és el moll de l'os, on aquest marcatge combinat amb l'expressió de determinats marcadors de superfície han ajudat a identificar les cèl·lules mare. Però també s'ha fet servir per a identificar cèl·lules mare al fol·licle pilós i a l'intestí¹⁰⁰.

Els resultats d'aquest assaig, realitzat en rates normals a les que se'ls va administrar la molècula sintètica BrdU en etapa neonatal, demostren l'existència de cèl·lules amb baixa taxa replicativa o estat "dorment" a les 3 capes dels vasos sanguinis que trobem al mesenter: a la capa endotelial, a la capa muscular i a l'adventícia, tan de artèries com de venes. No vam veure marcatge als adipòcits circumdants. Són cèl·lules quiescents, i positives pel marcador típic de cèl·lula mare cKit. Però sabem que a l'organisme hi ha tipus cel·lulars amb baixa taxa replicativa però que són terminals i especialitzades, per tant aquesta característica sola no la podem fer servir per identificar cèl·lules mare residents. Per això vam aïllar cèl·lules de la fracció de l'estroma vascular de mesenteris de rates on els havíem injectat la molècula BrdU en etapa neonatal, i les vam posar en cultiu en suspensió, en un assaig de formació d'esferes. Vam analitzar la presència de la molècula BrdU a les esferes que s'havien format i vam veure que havien retingut el marcatge en 3 dies en cultiu. Com que el medi de cultiu és molt ric en factors de creixement, les esferes proliferen molt i acaben diluint el marcatge als 6 dies. Per tant, podem dir que les cèl·lules amb característiques funcionals "stem" estudiades *in vitro* són efectivament les cèl·lules que retenen BrdU *in vivo*, encara que al revés potser no es pugui dir al 100%.

L'existència de cèl·lules progenitores residents als vasos sanguinis ha estat ja provada però no s'ha descrit res fins ara sobre la presència de cèl·lules progenitores en mesenter i vena porta. Sí que hi ha literatura que situa aquesta població en artèria toràctica humana, vasculatura de pulmó de ratolí o artèries coronàries^{60,101,102}. Aquests estudis mostren que hi ha cèl·lules progenitores compromeses en els llinatges endotelials,

muscular, cèl·lules mesenquimals, cèl·lules vasculars multipotents i cèl·lules progenitores de macròfags de l'adventícia⁶⁰. Però els mecanismes que les activen, les acaben de diferenciar i per tant com participen directament en processos patològics (per exemple una angiogènesi patològica) tot just s'estan començant a estudiar. Per exemple se sap que el flux laminar i el VEGF són responsables, via Flk-1-PI3K-Akt de l'activació i estabilització de la desacetilasa 3 d'histones (HDAC3) que desacetila la proteïna p53 i activa la p21, portant a la diferenciació cap a cèl·lula endotelial, i posant de relleu la importància de la epigenètica en la regulació dels mecanismes d'activació i diferenciació, i obrint la porta a l'ús de fàrmacs per inhibir o potenciar aquests processos⁶².

En el nostre estudi vam voler veure si aquestes cèl·lules residents que havíem trobat en els vasos del mesenteris contribuïen directament en la neovascularització associada a hipertensió i que fins ara es creia que només passava per fenòmens d'angiogènesi. Per això vam induir hipertensió portal i/o cirrosi (amb els models de lligadura parcial de la vena porta i lligadura del conducte biliar) a ratolins prèviament marcats amb la molècula BrdU i vam analitzar la seva presència a diferents temps després de la inducció. El primer que crida l'atenció és l'augment de cèl·lules amb marcatge BrdU+ en la paret dels vasos sanguinis de mesenteris, que creix fins a un pic a les 72h i després va decreixent en els següents dies. La senyal dins els nuclis deixa de ser compacta i intensa i comença a aparèixer puntejada i més tènue, fruit de la dilució del marcatge a les cèl·lules filles, cosa que suggereix una activació i proliferació de les cèl·lules dorments en resposta a un estímul, que és primàriament la hipertensió portal. La caracterització fenotípica amb marcadors de superfície va mostrar que sobretot a la capa adventícia hi havia moltes cèl·lules amb una morfologia fusiforme positives per a CD34 i Flk-1 cosa que concordava amb un llinatge endotelial però també cèl·lules positives per marcadors mesenquimals com CD73, CD44 i desmina, suggerint que podria existir una població heterogènia amb capacitat de donar lloc a cèl·lules endotelials i de múscul llis en un context d'hipertensió portal. A més, aquesta zona, situada a la zona vasculogènica ja descrita a la literatura^{59,60,62} és rica en l'expressió de factors de creixement proangiogènics com VEGF, PDGF o TGF- β ,

que segurament ofereixen un ambient molt apropiat per a l'activació i diferenciació de cèl·lules progenitores així com per afavorir processos angiogènics comuns.

Però el resultat més interessant d'aquest estudi va ser trobar marcatge del marcador BrdU en un gran percentatge de vasos de nova formació situats al voltant dels vasos preexistents, demostrant que les cèl·lules amb baixa taxa replicativa o dorments participen de manera directa i gens menyspreable a la formació de nova vasculatura. La colocalització del BrdU amb molècules de llinatge endotelial, com Flk-1, però també amb molècules de llinatge muscular com alfa-actina de múscul llis demostra que les cèl·lules progenitores residents al vas poden diferenciar-se a endoteli o múscul i participant per tant en la formació d'un vas madur i funcional.

En resum els resultats d'aquest primer estudi demostren que els vasos sanguinis del territori esplàncnic i de la vena porta són reservori de cèl·lules amb caràcter progenitor que davant determinats estímuls com la hipertensió portal, s'activen i es diferencien en tipus cel·lulars vasculars, integrant-se en la nova vasculatura. Per tant podem afirmar que fenòmens d'angiogènesi i vasculogènesi es combinen per donar lloc a la neovascularització patològica associada a la hipertensió portal. Destacar també vam trobar cèl·lules amb marcatge BrdU+ a la paret vascular de l'artèria aorta i de la vena cava de les rates, però que en situació d'hipertensió portal no hi vam veure canvis: ni dilució del marcatge per proliferació ni canvi en el seu nombre. Aquest fet demostra que no es veuen afectats per processos de neovascularització durant el desenvolupament de la hipertensió portal i que per tant l'activació i proliferació de les cèl·lules progenitores del llit vascular mesentèric és depenent del context de la malaltia i per tant restringit a les àrees afectades.

Després d'aquestes troballes és lògic preguntar-se com aquestes cèl·lules s'activen, es mobilitzen i acaben formant part dels nous vasos en un context patològic. A l'espera d'estudis que acabin d'esclarir els mecanismes i molècules implicades en aquests processos, sorgeixen moltes qüestions: quina proporció d'aquestes cèl·lules trobades en la zona vasculogènica, a l'adventícia, tenen aquesta capacitat progenitora en realitat? És

diferent aquesta proporció segons el llit vascular? Quines interaccions cel·lulars i moleculars mantenen aquestes cèl·lules quiescents en situacions fisiològiques normals i sota quines condicions es poden activar potencialment? Es pot explorar aquest paradigma terapèuticament?

Recents descobertes del grup han posat de manifest la importància de la regulació dels nivells d'expressió del factor VEGF en la progressió de l'angiogènesi en la hipertensió portal. CPEB1 i CPEB4 actuen seqüencialment per afavorir una poliadenilació del missatger de VEGF i activar així la seva traducció i al final elevar els nivells de la proteïna en el teixit⁸². El paper de CPEB4 també s'ha estudiat molt en proliferació i recentment s'ha vist la seva implicació en patologies com el càncer de pàncrees. En aquest cas una sobreexpressió de CPEB4 correlaciona amb un increment de la malignitat, major creixement tumoral i més vascularització⁹¹. Pel que fa al camp de les cèl·lules mare hi ha estudis que relacionen CPEB4 amb el control de la diferenciació en la línia eritrocitària¹⁰³, i també s'ha vist que uns baixos nivells de CPEB1 condueixen a fenòmens de transició epiteli a mesènquima en cèl·lules epitelials de mama murines¹⁰⁴. Per això vam voler veure si en el nostre cas CPEB4 està implicada en el mecanisme que controla la proliferació de les cèl·lules progenitores. Sabem, de la caracterització fenotípica per immunohistoquímica que CPEB4 es sobreexpressa sobretot a la zona de l'adventícia dels vasos del mesenter, on es sol descriure la zona vasculogènica, i de fet els seus nivells proteics s'eleva en el mesenter total en les primeres hores després d'induir la hipertensió portal. És a l'adventícia on sobretot colocalitza el seu marcatge amb el marcador BrdU, just en el moment en què sabem que hi ha una alta proliferació (gran quantitat de senyal Ki67+). Com que això suggeriria un paper regulador d'aquesta proteïna en la població BrdU+ que ja sabem que s'activa, prolifera i es diferencia a tipus cel·lulars vasculars, vam voler determinar quina expressió té CPEB4 en les esferes generades en el cultiu en suspensió. Els models animals genètics on podem tenir deplecionada aquesta proteïna de manera induïble ens van ajudar a desxifrar el seu paper en la vasculogènesi. Ja sabíem, per estudis previs del grup, que els mesenteris

de ratolins KO per a CPEB4 tenien disminuïda la neovascularització després d'haver induït hipertensió portal, sense que quedés afectada la vasculatura normal preexistent⁸².

Així que el que vam voler veure era si l'absència d'aquesta proteïna reguladora, a part d'afectar a l'angiogènesi també podia afectar a la vasculogènesi. Amb aquest objectiu es va aïllar i cultivar en suspensió la fracció de l'estroma vascular de mesenteris de ratolins KO-induïbles de CPEB4. Les cèl·lules es van tractar amb tamoxifè des de el primer moment per eliminar la proteïna ja a temps zero.

La quantificació del nombre i mida de les esferes van revelar que eliminar la proteïna CPEB4 de les cèl·lules progenitores generava menys esferes i eren més petites que les procedents de cèl·lules progenitores amb fenotip salvatge (WT). Aquest resultat indicaria que CPEB4 estaria implicada en la sortida de la quiescència de les cèl·lules progenitores i en la proliferació de les cèl·lules en trànsit, també conegudes amb el nom de "transit amplifying cells". O dit d'una altra manera, en absència de CPEB4 les cèl·lules progenitores mantindrien un estatus més quiescent, més dormant. Quan vam disgregar les esferes generades en primer terme i les vam posar de nou en cultiu en suspensió per obtenir una segona generació vam trobar un nombre més elevat d'esferes en el genotip KO que no pas en el WT suggerint que s'hauria conservat més aquesta capacitat quiescent en absència de CPEB4, mantenint un estatus més "stem", essent per tant capaces de donar lloc a més esferes. Com que a més tindrien compromesa la proliferació en absència de CPEB4, aquests esferoides tindrien una mida més petita, tal i com veiem de manera clara. Aquest resultat el vam corroborar amb un experiment per mesurar la taxa replicativa d'aquestes esferes, amb un pols de BrdU, i efectivament vam veure que les esferes KO per CPEB4 exhibien menor percentatge de cèl·lules en cicle respecte a les esferes amb fenotip salvatge. Aquesta propietat no era general per a totes les cèl·lules, només es va observar en les que tenien caràcter progenitor, ja que el mateix assaig va ser realitzat en cèl·lules adherides a plàstic i per tant diferenciades, i aquesta diferència en la taxa de replicació no es va donar.

L'activació local de CPEB4 durant la hipertensió portal i que podria "despertar" les cèl·lules progenitores dorments podria ser deguda a canvis hemodinàmics del vas (estrès mecànic, per lliscament, augment del flux...), citocines o factors de creixement que es veuen regulats a l'alça en aquest microambient tant concret. Aquests descobriments podrien tenir implicacions translacionals directes, ja que el paper de CPEB4 tant en angiogènesi com en vasculogènesi, fan d'aquesta molècula una diana a tenir en compte en una possible teràpia antivascular associada a la hipertensió portal.

Pel que fa al segon treball d'aquesta tesi doctoral, podríem dir que utilitza el coneixement bàsic previ en el camp de l'angiogènesi patològica per avaluar un sistema innovador de teràpia gènica basat en l'ús de ARN interferents; Un treball preclínic que pretén oferir una alternativa amb una aplicabilitat terapèutica per als pacients amb hipertensió portal.

Recordem que els vasos portocol·laterals, també anomenats "shunts" i entre els que trobem les varius gastroesofàgiques, són els responsables d'una de les complicacions més representatives i severes de la hipertensió portal: el sagnat massiu i agut que sovint és torrencial i difícil d'aturar, resultant fatal pel pacient. A banda d'això, la desviació de la sang venosa portal a la circulació portosistèmica afavoreix l'aparició d'encefalopatia hepàtica, empitjora el dany hepàtic, incrementa la susceptibilitat a patir sèpsia i intensifica la circulació hiperdinàmica^{1,24}. Per tant, tota recerca en aquest camp que ajudi a entendre els mecanismes, vies i factors que promouen la seva formació és essencial per poder dissenyar estratègies terapèutiques eficaces i segures que previnguin i redueixin la col·lateralització i que en últim terme permetin reduir la morbiditat i mortalitat dels pacients amb malalties hepàtiques cròniques.

Els estudis dels darrers anys han demostrat que el desenvolupament de vasos col·laterals portosistèmics implica la reobertura de canals embrionaris preexistents però també la formació de nous vasos mitjançant processos angiogènics. Aquests nous vasos pateixen també canvis estructurals i funcionals (remodelat vascular) per fer-los efectius

descomprimint el sistema venós portal¹⁰⁵. I en relació amb això, hi ha estudis que demostren la importància del receptor 2 de VEGF, també conegut com “kinase insert domain receptor” (KDR) en el desenvolupament d’aquests vasos col·laterals^{35,36}. Això el fa bona diana terapèutica alhora de dissenyar estratègies per prevenir i reduir aquesta col·lateralització.

Per tant, la finalitat del **segon estudi** d’aquesta tesi doctoral va ser descriure una possible estratègia terapèutica pels pacients amb varius associades a hipertensió portal, basada en l’ús de ARN interferents curts contra el ARN missatger de KDR que atenuïn la producció d’aquest receptor i en conseqüència redueixin l’angiogènesi necessària en part per a la formació d’aquests vasos col·laterals.

El desenvolupament de les seqüències d’ARN interferents contra el ARN missatger de KDR va ser realitzat per la companyia Silence Therapeutics, que va seleccionar i testar in vitro diversos ARN interferents contra l’ARN missatger del gen KDR. Les seqüències que van resultar més efectives bloquejant la síntesi proteica d’aquest receptor són les que nosaltres vam utilitzar per als següents assajos. A part de ser modificades químicament per assegurar-ne la seva estabilitat, aquestes seqüències van ser encapsulades formant el que anomenem lipoplexes siRNA^{KDR} que a més de preservar les seves funcions biològiques els dirigeixen específicament a les cèl·lules endotelials vasculars, responsables de la formació del nou brot vascular o “sprout”, i que és on es pretén que facin la seva funció inhibidora.

Els resultats in vitro van demostrar que tant les cèl·lules endotelials humanes HUVEC, com les murines H5V (cèl·lules endotelials transformades i carcinogèniques) transfectades amb els lipoplexes siRNA^{KDR} aconseguen reduir els nivells de ARN missatger de KDR de manera molt remarcable, només 48 hores després de la seva transfecció. La comprovació mitjançant immunoblot dels nivells proteics de KDR va demostrar efectivament la disminució de la producció del receptor, que va resultar molt eficaç (fins a un 77%). Es van fer servir com a controls cèl·lules H5V transfectades amb el liposoma buit i també lipoplexes que duen un siRNA irrellevant, el del gen de la luciferasa.

L'assaig de tubulogènesi en matrigel va demostrar que efectivament les cèl·lules H5V transfectades amb els lipoplexes siRNA^{KDR} tenien compromesa en gran mesura la seva capacitat de formar estructures tubulars tipus xarxa capil·lar, i que per tant això era dependent de KDR. El fet que les H5V siguin cèl·lules provinents d'endotelioma les fa ser un bon i apropiat model per aquests experiments, ja que tenen un fenotip activat, són altament proliferatives i expressen de manera constitutiva alts nivells de VEGF i KDR⁸².

Havent demostrat l'eficàcia *in vitro*, calia demostrar si passava el mateix *in vivo*; Per provar l'eficàcia terapèutica d'aquests lipoplexes vam fer servir un model animal d'hipertensió portal ben caracteritzat, la lligadura parcial de la vena porta o PPVL. Com ja sabem d'estudis previs que aquest model presenta un alt grau de col·lateralització portosistèmica a temps curts, el vam considerar molt útil per avaluar si l'ús *in vivo* dels lipoplexes siRNA^{KDR} podia reduir la formació d'aquests vasos^{35,36}.

Primerament vam realitzar un estudi de captació, per comprovar que efectivament aquests lipoplexes arribaven de manera específica a les cèl·lules endotelials vasculars. Vam fer servir la tecnologia AtuPLEXTM de la companyia Silence Therapeutics que prèviament ja havien demostrat i reportat la capacitat d'aquest lipoplexe per arribar a l'endoteli vascular de ratolí i oferir un bon silenciament gènic¹⁰⁶. No obstant, no s'havia demostrat l'eficàcia de captació d'aquests lipoplexes per l'endoteli del mesenter i o de la vena porta, ambdós teixits diana del nostre estudi; així que provar que aquesta tecnologia realment arribava al lloc on fer la seva funció també va ser un objectiu important d'aquesta tesi doctoral. Aquests liposomes encapsulen les seqüències de ARN interferent protegint-les de la degradació per part de les ribonucleases i del propi flux sanguini, i facilitant la seva transferència a través de les membranes cel·lulars diana.

Per monitoritzar la captació dels lipoplexes AtuPLEXTM per part de l'endoteli vascular es va fer servir l'AtuPLEX-Cy3, és a dir un lipoplexe amb un siRNA irrellevant conjugat amb la molècula fluorescent cianina 3. Es va administrar al ratolí per via endovenosa (vena de la cua) després de 5 dies d'haver induït hipertensió portal mitjançant

PPVL. Mitjançant microscòpia confocal es va detectar una considerable senyal de Cy3 en la capa endotelial de la microvasculatura mesentèrica, sobretot a les vèdules, així com en l'endoteli de les venes portals intrahepàtiques. La col·localització d'aquesta senyal amb el marcador endotelial CD31 demostrava l'especificitat de captació d'aquest lipoplexe per part de l'endoteli vascular. Cal destacar també que gran part del lipoplexe fluorescent s'acumulava en l'endoteli dels vasos de nova formació i que no vam veure marcatge en les altres capes del vas sanguini, ni a la muscular ni a l'adventícia. En conclusió, el lipoplexe AtuPLEX va resultar perfectament idoni per a dirigir el siRNA^{KDR} a les cèl·lules endotelials de ratolins amb hipertensió portal i testar si la tecnologia pot reduir la formació de vasos portocol·laterals.

El disseny experimental es va basar en un tractament preventiu, on es van administrar diàriament durant 4 dies injeccions endovenoses dels lipoplexes AtuPLEX siRNA^{KDR} i AtuPLEX siRNA^{Luciferase} començant immediatament després d'haver induït la hipertensió portal al ratolí per PPVL. Els resultats van confirmar la marcada reducció dels nivells de KDR en els mesenteris dels ratolins amb hipertensió portal, si es compara amb els nivells del receptor en ratolins tractats amb el lipoplexe AtuPLEX siRNA^{Luciferase}. És important destacar que aquesta estratègia basada en ARN interferents no aboleix totalment l'expressió proteica dels gen, com ho podria fer la generació dels knock out, sinó que sempre queda un mínim d'expressió que permet preservar uns nivells "basals" que en el nostre cas serien beneficiosos perquè ajudarien a mantenir la homeòstasi vascular dels vasos sans de tot l'organisme. Però el més rellevant de l'estudi va ser poder confirmar la hipòtesi que disminuint els nivells del receptor KDR amb el silenciament del seu gen aconseguíem reduir dràsticament la col·lateralització portosistèmica (fins a un 73%). Per altra banda, i no menys important, aquest disseny experimental no va donar mostra d'efectes adversos de cap tipus; ni pèrdues de pes, debilitat, comportament, ni canvis en paràmetres bioquímics d'alteració de la funció hepàtica, com les transaminases, ni evidències histològiques d'inflamació o toxicitat al fetge.

El silenciament dels nivells de KDR també va afectar el remodelat vascular, un mecanisme important per al manteniment i l'extensió dels vasos col·laterals en la hipertensió portal. Se sap que el receptor KDR pot actuar com un mecanoreceptor i activar-se quan percep canvis de flux (i per tant independent de lligand)¹⁰⁷. Els resultats del nostre estudi mostren com la vena porta dels animals tractats amb el lipoplexe AtuPLEX siRNA^{KDR} presenta un menor remodelat, basat en la disminució de factors típics d'aquest procés com el TGF- β o el PDGF- β .

Pel que fa a l'angiogènesi que es dona activament en els mesenteris dels ratolins amb hipertensió portal, els resultats indiquen que aquest protocol de silenciament *in vivo* és capaç de modular l'angiogènesi patològica en aquest territori: disminueixen els nivells del marcador de cèl·lula endotelial i índex d'angiogènesi CD31 i també el número de cèl·lules endotelials proliferants (que expressen el marcador Ki67) presents en les microvènules mesentèriques. No obstant això, no es van observar diferències significatives pel que fa a la densitat vascular: és a dir, el recompte de vasos (nous i preexistents) en els mesenteris dels ratolins tractats no era significativament diferent en ambdós tractaments, per bé que sí es va apreciar una tendència a atenuar aquesta neovascularització patològica en el grup tractat amb el lipoplexe AtuPLEX siRNA^{KDR}. Una possible explicació per aquest resultat podria residir precisament en les conclusions del primer estudi, on hem demostrat que en situacions d'hipertensió portal la neovascularització patològica es dona per la combinació de fenòmens d'angiogènesi i de vasculogènesi. Així doncs, tot i que el tractament amb el lipoplexe AtuPLEX siRNA^{KDR} podria actuar afectant l'angiogènesi, potser la formació de nous vasos a partir de cèl·lules progenitores és independent de la via de VEGFR2 / KDR i per tant no és diana d'aquest tractament en concret. Això explicaria perquè sí que veiem una reducció en el nombre de vasos comptats en els mesenteris tractats amb el lipoplexe AtuPLEX siRNA^{KDR} però que no arriba a ser una diferència amb significança estadística.

A nivell hemodinàmic només comentar que el tractament amb AtuPLEX siRNA^{KDR} no va modificar la mida i pes de la melsa respecte al grup control. La mida i pes de la melsa

s'utilitza com a marcador indirecte d'hipertensió portal, ja que augmenta molt amb l'increment de pressió portal. D'això se'n conclou que la disminució de la col·lateralització deguda al tractament amb l'ARN interferent de KDR ocorre independent a l'increment de la pressió portal, tal i com veiem en anteriors estudis del grup¹⁰⁸.

A manera de resum, aquest estudi planteja una estratègia innovadora de silenciament mitjançant ARN interferents encapsulats en liposomes, uns lipoplexes dissenyats per a que es distribueixin sistèmicament de manera segura i eficaç fins a l'endoteli vascular, incorporant-s'hi de manera específica per fer la seva funció només en aquest tipus cel·lular. Aquesta característica permet també que no siguin necessàries grans quantitats de lipoplexes d'ARN interferent, limitant així la probabilitat que apareguin efectes adversos derivats d'un tractament sistèmic.

L'eficiència provada del tractament amb els lipoplexes AtuPLEX siRNA^{KDR} representa una aproximació terapèutica prometedora per minimitzar la formació dels vasos portocol·laterals. A més el disseny experimental de l'estudi, basat en un tractament de prevenció, es podria traslladar clínicament en una estratègia profilàctica dirigida a evitar l'evolució de les petites varius a varius de gran diàmetre, que en últim terme són més susceptibles a la ruptura i per tant al sagnat. D'altra banda, la bona tolerància i absència d'efectes adversos del tractament i el fet que ha entrat en fase d'assajos clínics pel tractament de pacients amb tumors sòlids avançats fan que aquest sistema innovador de teràpia gènica resulti una eina potencialment útil per a la clínica dels pacients amb hipertensió portal i malaltia crònica del fetge. I donat que l'angiogènesi és un fenomen destacat en nombrosos processos patològics com ara l'obesitat, el creixement tumoral o la inflamació, creiem que l'ús dels lipoplexes AtuPLEX siRNA^{KDR} podria ser considerada una eina terapèutica d'ampli espectre a tenir en compte.

Conclusions

6. Conclusions

Les conclusions de la present tesi doctoral són les que detallo a continuació, separades en els dos treballs:

ESTUDI 1: Identificació i caracterització de cèl·lules progenitores vasculars i el seu possible paper en la neovascularització associada a la hipertensió portal.

1. ***El mesenteri adult és un reservori constitutiu de cèl·lules residents amb característiques progenitores.*** El cultiu en suspensió va demostrar l'existència de cèl·lules al mesenteri amb capacitat auto-regeneradora o "self-renewal", d'origen clonal i amb característiques fenotípiques compartides entre llinatges "stem" i de progenitores vasculars.
2. ***Les cèl·lules progenitores presents al mesenteri tenen propietats vasculogèniques in vitro.*** Els experiments amb matrigel van demostrar la capacitat de diferenciar-se a cèl·lula endotelial tant de les esferes (formant "sprouts") com de les cèl·lules provinents de les esferes (formant estructures en xarxa). També poden donar lloc a perícits i/o cèl·lula muscular quan les adhirim a substrat o quan es cocultiven (prèviament pretractades amb el factor PDGF) amb cèl·lules endotelials HUVEC.
3. ***Les cèl·lules progenitores vasculars resideixen a les capes vasculars dels vasos mesentèrics i de la vena porta.*** La tècnica del "Long-term label-retaining assay" va demostrar l'existència de cèl·lules amb baixa capacitat replicativa en les tres capes del vas: endotelial, muscular i adventícia, de mesenteri i vena porta de rata. Es

troben mitòticament quiescents en condicions fisiològiques, expressen el marcador stem ckit i són capaces de créixer en suspensió.

4. ***Les cèl·lules progenitores vasculars donen lloc a una progènie que prolifera i es diferencia a cèl·lula endotelial i cèl·lula de múscul llis vascular i contribueixen a la neovascularització de la hipertensió portal.*** Davant l'estímul de la hipertensió portal, aquestes cèl·lules prolifereixen i acaben formant part dels nous vasos del mesenter, incorporant-se a les diferents capes del vas.

5. ***CPEB4 és important per a la capacitat proliferativa de les cèl·lules progenitores vasculars residents.*** Els nivells de CPEB4 es troben elevats en els mesenteris de rates amb hipertensió portal i a més, la seva presència en la zona perivascular altament proliferativa colocalitza en part amb el marcatge BrdU+. Les esferes provinents de mesenter també expressen CPEB4. La depleció de CPEB4 redueix la neovascularització en hipertensió portal, i els cultius en suspensió demostren que en absència de CPEB4 es generen menys esferes i que són més petites. Els assajos de proliferació *in vitro* demostren que efectivament les esferes KO per CPEB4 tenen compromesa la divisió cel·lular.

ESTUDI 2: Inhibició específica per teràpia gènica de VEGFR2 en cèl·lules endotelials en ratolins amb hipertensió portal.

1. ***Les seqüències de ARN interferents contra KDR desenvolupades in silico són altament eficients in vitro.*** Els nivells de l'ARN missatger i de proteïna del receptor KDR van disminuir remarcablement tant en cèl·lula endotelial humana (HUVEC) com en cèl·lula endotelial transformada murina (H5V) després de la transfecció amb els lipoplexes amb el ARN interferent de KDR.
2. ***El silenciament de KDR mitjançant els lipoplexes amb ARN interferent redueix dràsticament la tubulogènesi in vitro de les cèl·lules endotelials H5V.*** La capacitat de formar xarxes tubulars en matrigel de les cèl·lules H5V es veu greument compromesa quan s'inhibeixen els nivells proteics de KDR mitjançant el silenciament del seu ARN missatger.
3. ***Els lipoplexes dissenyats per arribar i fer la seva funció a l'endoteli vascular de l'organisme són captats de manera efectiva i específica per les cèl·lules de l'endoteli del mesenter i de la vena porta.*** Els estudis de captació amb ARN interferents conjugats amb fluoròfors en un model d'hipertensió portal en ratolí van demostrar la correcta distribució dels lipoplexes, que sobretot són captats pels nous vasos en formació i per les microvènules del mesenter.
4. ***El tractament amb els lipoplexes AtuPLEX siRNA^{KDR} silencia de manera efectiva els nivells proteics del receptor KDR en mesenter i fetge de ratolins amb hipertensió portal.*** Els nivells del receptor, que en mesenter es troben

sobreexpressats en condicions d'hipertensió portal, cauen fins a un 75% en els animals tractats amb l'ARN interferent.

5. ***La teràpia amb els lipoplexes AtuPLEX siRNA^{KDR} atenua la formació i desenvolupament dels vasos portocol·laterals en ratolins amb hipertensió portal.*** El remodelat vascular també es troba compromès i a nivell de mesenteri s'observa una tendència a disminuir la neovascularització patològica associada a aquesta síndrome.
6. ***Els nivells de KDR després del tractament amb els lipoplexes AtuPLEX siRNA^{KDR} no queden abolits totalment.*** Això resulta beneficiós per al manteniment de la homeòstasi vascular. No s'aprecien efectes adversos associats al tractament: no s'altera ni la funció hepàtica ni la renal ni s'observen signes d'inflamació al fetge.

Bibliografia

7. Bibliografia

1. Bosch, J., Groszmann, R. J. & Shah, V. H. Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: How changes in paradigm are leading to successful new treatments. *Journal of Hepatology* **62**, S121–S130 (2015).
2. Garcia-Tsao, G. & Bosch, J. Management of Varices and Variceal Hemorrhage in Cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **362**, 823–832 (2010).
3. Bhathal, P. S. & Grossman, H. J. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J. Hepatol.* **1**, 325–337 (1985).
4. Berzigotti, A. & Bosch, J. Pharmacologic management of portal hypertension. *Clinics in Liver Disease* **18**, 303–317 (2014).
5. Gracia-Sancho, J., Maeso-Díaz, R., Fernández-Iglesias, A., Navarro-Zornoza, M. & Bosch, J. New cellular and molecular targets for the treatment of portal hypertension. *Hepatology International* **9**, 183–191 (2015).
6. Friedman, S. Liver fibrosis: from bench to bedside. *J. Hepatol.* **38**, 38–53 (2003).
7. Huie, R. E. & Padmaja, S. The reaction of no with superoxide. *Free Radic. Res.* **18**, 195–199 (1993).
8. Gupta, T. K., Toruner, M., Chung, M. K. & Groszmann, R. J. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* **28**, 926–931 (1998).
9. Rockey, D. C. *et al.* Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: Potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology* **27**, 472–480 (1998).

10. Bataller, R. *et al.* Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **118**, (2000).
11. Birney, Y., Redmond, E. M., Sitzmann, J. V. & Cahill, P. A. Eicosanoids in cirrhosis and portal hypertension. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* **72**, 3–18 (2003).
12. Pinzani, M. Liver Fibrosis. in *Springer Semin Immunopathol.* **21**(4) 475–90 (1999).
13. Bataller, R. & Brenner, D. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* **115**, 209–218 (2005).
14. Hellerbrand, C., Stefanovic, B., Giordano, F., Burchardt, E. R. & Brenner, D. a. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J. Hepatol.* **30**, 77–87 (1999).
15. Seki, E. *et al.* TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat. Med.* **13**, 1324–1332 (2007).
16. Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J. P. & Fallowfield, J. A. Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature Reviews Immunology* **14**, 181–194 (2014).
17. Vinas, O. *et al.* Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* **38**, 919–929 (2003).
18. Duffield, J. S. & Forbes, S. J. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. ...* (2005).
19. Ramachandran, P. *et al.* Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E3186–E3195 (2012).
20. Imamura, M., Ogawa, T., Sasaguri, Y., Chayama, K. & Ueno, H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* **128**, 138–146 (2005).

-
21. Pradere, J.-P. *et al.* Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 1–80 (2013). doi:10.1002/hep.26429
 22. Groszmann, R. J. & Abraldes, J. G. Portal hypertension: from bedside to bench. *J. Clin. Gastroenterol.* **39**, S125–S130 (2005).
 23. Vorobioff, J., Bredfeldt, J. E. & Groszmann, R. J. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology* **87**, 1120–1126 (1984).
 24. Fernández, M. *et al.* Pathogenesis of portal hypertension: Extrahepatic Mechanisms. *Curr Hepatol. Rep* **15**, 199–207 (2016).
 25. Iwakiri, Y., Shah, V. & Rockey, D. C. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis - Current status and future directions. *Journal of Hepatology* **61**, 912–924 (2014).
 26. Abraldes, J. G. Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G980–G987 (2005).
 27. Sumanovski, L. T., Battegay, E., Stumm, M., Van Der, K. M. & Sieber, C. C. Increased angiogenesis in portal hypertensive rats: role of nitric oxide. *Hepatology* **29**, 1044–1049 (1999).
 28. Hagendoorn, J. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase regulates microlymphatic flow via collecting lymphatics. *Circ. Res.* **95**, 204–209 (2004).
 29. Fernandez, M., Lambrecht, R. W. & Bonkovsky, H. L. Increased heme oxygenase activity in splanchnic organs from portal hypertensive rats: Role in modulating mesenteric vascular reactivity. *J. Hepatol.* **34**, 812–817 (2001).

30. Oberti, F. *et al.* Role of prostacyclin in hemodynamic alterations in conscious rats with extrahepatic or intrahepatic portal hypertension. *Hepatology* **18**, 621–627 (1993).
31. Pizcueta, P. *et al.* Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* **103**, 1909–15 (1992).
32. Coll, M. *et al.* Down-regulation of genes related to the adrenergic system may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *J. Hepatol.* **49**, 43–51 (2008).
33. Fernández-Varo, G. *et al.* Impaired extracellular matrix degradation in aortic vessels of cirrhotic rats. *J. Hepatol.* **46**, 440–446 (2007).
34. Fernández, M. *et al.* Angiogenesis in liver disease. *Journal of Hepatology* **50**, 604–620 (2009).
35. Fernandez, M., Vizzutti, F., Garcia-Pagan, J. C., Rodes, J. & Bosch, J. Anti-VEGF Receptor-2 Monoclonal Antibody Prevents Portal-Systemic Collateral Vessel Formation in Portal Hypertensive Mice. *Gastroenterology* **126**, 886–894 (2004).
36. Fernandez, M. *et al.* Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J. Hepatol.* **43**, 98–103 (2005).
37. Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine* **9**, 685–693 (2003).
38. Mejias, M. *et al.* Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* **49**, 1245–1256 (2009).
39. Reiberger, T. *et al.* Sorafenib attenuates the portal hypertensive syndrome in partial

- portal vein ligated rats. *J. Hepatol.* **51**, 865–873 (2009).
40. Pinter, M. *et al.* The effects of sorafenib on the portal hypertensive syndrome in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma--a pilot study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **35**, 83–91 (2012).
 41. Hennenberg, M. *et al.* Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. *Lab. Investig.* **91**, 241–251 (2011).
 42. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).
 43. Carmeliet, P. Angiogenesis in Health and Disease : Therapeutic Opportunities. *Nat. Med.* **9**, 653–660 (2003).
 44. Mentzer, S. J. & Konerding, M. A. Intussusceptive angiogenesis: Expansion and remodeling of microvascular networks. in *Angiogenesis* **17**, 499–509 (2014).
 45. Donnem, T. *et al.* Non-angiogenic tumours and their influence on cancer biology. *Nature Reviews Cancer* **18**, 323–336 (2018).
 46. Mazurek, R. *et al.* Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease. in *Advances in Pharmacology* **78**, 323–350 (2017).
 47. Augustin, H. G., Young Koh, G., Thurston, G. & Alitalo, K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 165–177 (2009).
 48. Blasi, F. & Carmeliet, P. uPAR: A versatile signalling orchestrator. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 932–943 (2002).
 49. Phng, L. K. & Gerhardt, H. Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch. *Developmental Cell* **16**, 196–208 (2009).

50. Hellström, M. *et al.* Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* **152**, 543–553 (2001).
51. Benedito, R. *et al.* The Notch Ligands Dll4 and Jagged1 Have Opposing Effects on Angiogenesis. *Cell* **137**, 1124–1135 (2009).
52. Drake, C. J. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* **69**, 73–82 (2003).
53. Damert, A., Miquerol, L., Gertsenstein, M., Risau, W. & Nagy, A. Insufficient VEGFA activity in yolk sac endoderm compromises haematopoietic and endothelial differentiation. *Development* **129**, 1881–1892 (2002).
54. Bianco, P., Robey, P. G. & Simmons, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell* **2**, 313–319 (2008).
55. Flamini, V., Jiang, W. G., Lane, J. & Cui, Y. X. Significance and therapeutic implications of endothelial progenitor cells in angiogenic-mediated tumour metastasis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **100**, 177–189 (2016).
56. Potenta, S., Zeisberg, E. & Kalluri, R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *British Journal of Cancer* **99**, 1375–1379 (2008).
57. Bianco, P. Bone and the hematopoietic niche: A tale of two stem cells. *Blood* **117**, 5281–5288 (2011).
58. Bautch, V. L. Stem cells and the vasculature. *Nature Medicine* **17**, 1437–1443 (2011).
59. Tilki, D., Hohn, H.-P., Ergün, B., Rafii, S. & Ergün, S. Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. *Trends Mol. Med.* **15**, 501–509 (2009).
60. Zengin, E. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* **133**, 1543–1551 (2006).

-
61. Naito, H., Kidoya, H., Sakimoto, S., Wakabayashi, T. & Takakura, N. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J.* **31**, 842–855 (2012).
 62. Psaltis, P. J. & Simari, R. D. Vascular wall progenitor cells in health and disease. *Circulation Research* **116**, 1392–1412 (2015).
 63. Majesky, M. W., Dong, X. R., Regan, J. N. & Hoglund, V. J. Vascular smooth muscle progenitor cells: Building and repairing blood vessels. *Circulation Research* **108**, 365–377 (2011).
 64. Rodriguez-Menocal, L. *et al.* The origin of post-injury neointimal cells in the rat balloon injury model. *Cardiovasc. Res.* **81**, 46–53 (2009).
 65. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* **9**, 669–676 (2003).
 66. Karkkainen, M. J., Mäkinen, T. & Alitalo, K. Lymphatic endothelium: A new frontier of metastasis research. *Nature Cell Biology* **4**, E2–E5 (2002).
 67. Gerber, H. P., Dixit, V. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 13313–13316 (1998).
 68. Ku, D. D., Zaleski, J. K., Liu, S. & Brock, T. a. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am. J. Physiol.* **265**, H586–92 (1993).
 69. Keyt, B. A. *et al.* The carboxyl-terminal domain (111–165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem.* **271**, 7788–7795 (1996).
 70. Simons, M., Gordon, E. & Claesson-Welsh, L. Mechanisms and regulation of

- endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 611–625 (2016).
71. Jin, Z. G. *et al.* Ligand Independent Activation of VEGF Receptor 2 by Fluid Shear Stress Regulates Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circ. Res.* **31**, 31 (2003).
72. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
73. Plein, A., Fantin, A. & Ruhrberg, C. Neuropilin regulation of angiogenesis, arteriogenesis, and vascular permeability. *Microcirculation* **21**, 315–323 (2014).
74. Kawamura, H. *et al.* Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. *Blood* **112**, 3638–3649 (2008).
75. Koch, S. *et al.* NRP1 Presented in trans to the endothelium arrests VEGFR2 endocytosis, preventing angiogenic signaling and tumor initiation. *Dev. Cell* **28**, 633–646 (2014).
76. Chen, T. T. *et al.* Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J. Cell Biol.* **188**, 595–609 (2010).
77. Jinnin, M. *et al.* Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nat. Med.* **14**, 1236–1246 (2008).
78. Shiojima, I. & Walsh, K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circulation Research* **90**, 1243–1250 (2002).
79. McMullen, M., Keller, R., Sussman, M. & Pumiglia, K. Vascular endothelial growth factor-mediated activation of p38 is dependent upon Src and RAFTK/Pyk2. *Oncogene* **23**, 1275–1282 (2004).
80. Fernandez, M. Molecular pathophysiology of portal hypertension. *Hepatology* **61**,

1406–1415 (2015).

81. Chang, S.-H. & Hla, T. Gene regulation by RNA binding proteins and microRNAs in angiogenesis. *Trends Mol. Med.* **17**, 650–658 (2011).
82. Calderone, V. *et al.* Sequential Functions of CPEB1 and CPEB4 Regulate Pathologic Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in Chronic Liver Disease. *Gastroenterology* **150**, 982–997.e30 (2016).
83. Richter, J. D. & Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477–480 (2005).
84. Ruggero, D. & Pandolfi, P. P. Does the ribosome translate cancer? *Nature Reviews Cancer* **3**, 179–192 (2003).
85. Avdulov, S. *et al.* Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell* **5**, 553–563 (2004).
86. Sawyers, C. L. Will mTOR inhibitors make it as cancer drugs? *Cancer Cell* **4**, 343–348 (2003).
87. Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., De Moor, C. H., Mendez, R. & Richter, J. D. Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol. Cell* **4**, 1017–1027 (1999).
88. D'Ambrogio, A., Nagaoka, K. & Richter, J. D. Translational control of cell growth and malignancy by the CPEBs. *Nature Reviews Cancer* **13**, 283–290 (2013).
89. Bava, F. A. *et al.* CPEB1 coordinates alternative 3'-UTR formation with translational regulation. *Nature* **495**, 121–125 (2013).
90. Fernández-Miranda, G. & Méndez, R. The CPEB-family of proteins, translational control in senescence and cancer. *Ageing Research Reviews* **11**, 460–472 (2012).

91. Ortiz-zapater, E. *et al.* Key contribution of CPEB4 - mediated translational control to cancer progression. *Online* **18**, 83–90 (2011).
92. Burns, D. M. & Richter, J. D. CPEB regulation of human cellular senescence, energy metabolism, and p53 mRNA translation. *Genes Dev.* **22**, 3449–60 (2008).
93. Cairns, R., Harris, I. & Mak, T. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95 (2011).
94. Coch, L. *et al.* Disruption of negative feedback loop between vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor decreases portal pressure, angiogenesis, and fibrosis in cirrhotic rats. *Hepatology* **60**, (2014).
95. Mejias, M. *et al.* Antiangiogenic and antifibrogenic activity of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in bile duct-ligated portal hypertensive rats. *Gut* **64**, (2015).
96. Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**, 873–887 (2011).
97. Sun, Y. *et al.* COD133 (Prominin) negative human neural stem cells are clonogenic and tripotent. *PLoS One* **4**, (2009).
98. Pastrana, E., Silva-Vargas, V. & Doetsch, F. Eyes wide open: A critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* **8**, 486–498 (2011).
99. Sottocornola, R. & Lo Celso, C. Dormancy in the stem cell niche. *Stem Cell Res. Ther.* **3**, 10 (2012).
100. Taylor, G., Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T. T. & Lavker, R. M. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* **102**, 451–461 (2000).
101. Bearzi, C. *et al.* Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 15885–15890 (2009).

102. Fang, S., Wei, J., Penttimikko, N., Leinonen, H. & Salven, P. Generation of Functional Blood Vessels from a Single c-kit⁺ Adult Vascular Endothelial Stem Cell. *PLoS Biol.* **10**, (2012).
103. Hu, W., Yuan, B. & Lodish, H. F. Cpeb4-Mediated Translational Regulatory Circuitry Controls Terminal Erythroid Differentiation. *Dev. Cell* **30**, 660–672 (2014).
104. Grudzien-Nogalska, E., Reed, B. C. & Rhoads, R. E. CPEB1 promotes differentiation and suppresses EMT in mammary epithelial cells. *J. Cell Sci.* **127**, 2326–2338 (2014).
105. Geerts, A. M. *et al.* Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: An in vivo study. *Liver Int.* **26**, 889–898 (2006).
106. Santel, A. *et al.* RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene Ther.* **13**, 1360–1370 (2006).
107. Tzima, E. *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **437**, 426–431 (2005).
108. Mejias, M. *et al.* Relevance of the mTOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension. *J. Hepatol.* **52**, (2010).

